



**Joana Marisa
Cavaleiro Vara**

Epigenética: potencialidades na genética forense

DECLARAÇÃO

Declaro que esta dissertação é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2013

**Joana Marisa
Cavaleiro Vara**

Epigenética: potencialidades na genética forense

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Maria de Lourdes Pereira
Professora Associada c/Agregação, DBio, UA

Luís Souto Miranda
Professor Auxiliar convidado, DBio, UA (orientador)

Vanessa Raquel Branco Bogas
Especialista Superior de Medicina Legal - 2º Classe

agradecimentos

Embora esta tese seja de autoria individual existem alguns contributos que desejo agradecer.

Ao meu orientador, o Professor Luís Souto, pela sua inegável competência técnico-científica na orientação paciente, dedicada e crítica ao longo deste percurso.

À minha família pela compreensão e encorajamento, sem a qual esta tese não teria sido possível.

palavras-chave

Epigenética, genética forense, metilação do DNA.

resumo

A epigenética é um conjunto de processos hereditários e reversíveis que não alteram a sequência do DNA, alterando, no entanto a sua expressão. De entre os vários processos epigenéticos existentes destacam-se a metilação e a modificação de histonas.

A metilação é um processo estável e que pode ser usado em diversos estudos, no âmbito forense, como a identificação de fluidos/tecidos, paternidade, estimativa de idade, discriminação de gémeos monozigóticos, identificação de causa e circunstâncias de morte e estudos neuropsiquiátricos. Em relação às metodologias usadas no estudo da metilação, destanca-se o método baseado na conversão por bissulfito.

A epigenética ainda é um campo muito recente, por isso outros estudos devem ser desenvolvidos para que se tenha uma melhor caracterização do padrão de metilação humana, melhorar metodologias e controlar variáveis importantes, como fator ambiental.

Conclui-se com base nos estudos observados que as técnicas baseadas em eventos de metilação do DNA, devem ser vistas como potenciais ferramentas em genética forense, destacando-se a previsão de idade como um bom exemplo desse mesmo potencial.

keywords

DNA methylation, epigenetics, forensic genetics.

abstract

The epigenetic is a group of heritable and reversible processes which do not alter the DNA sequence, altering, however its expression. Among the various epigenetic processes existing stand out methylation and histone modification. The methylation process is stable and that can be used in several studies under forensic such as identification of fluids/tissues, parenthood, age estimation, discrimination of monozygotic twins, identifying the cause and circumstances of death and neuropsychiatric studies. In relation to methods used to study the methylation destanca the method based on the conversion of bisulfite.

The epigenetic field is still very new, so further studies should be developed in order to have a better characterization of the human methylation pattern, improving methodologies and control important variables such as environmental factor.

The conclusion is based on studies observed that the techniques based on DNA methylation events should be seen potential valuable tools in forensic genetics, especially the prediction of age as a good example of this same potential.

Índice

I.	Figuras	ii
II.	Tabelas	iii
III.	Siglas	iv
1.	Introdução	1
2.	Genética vs Epigenética.....	3
3.	Origens e evolução do conceito de Epigenética	7
4.	Mecanismos epigenéticos.....	11
4.1.	Metilação do DNA	12
4.2.	Modificação de histonas	23
4.3.	Outros processos epigenéticos.....	28
5.	Metodologias de determinação da presença de metilação	29
5.1.	Metilação sensível a enzimas de restrição	29
5.2.	Modificação química de resíduos de citosina não metilados.....	32
5.2.1.	Conversão por bissulfito.....	32
5.2.1.1.	COBRA (<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>).....	34
5.2.1.2.	MSP (<i>Methylation-specific PCR</i>).....	35
5.2.1.3.	MSP em tempo real e <i>MethyLight</i>	36
5.2.1.4.	Pirosequenciação	38
5.2.1.5.	MassARRAY®	39
5.3.	Interação de proteínas com 5-metilcitosina	42
6.	Aplicações forenses	45
6.1.	Identificação de fluidos/tecidos	48
6.2.	Paternidade	54
6.3.	Discriminação de gémeos monozigóticos	57
6.4.	Determinação da causa e circunstâncias de morte.....	58
6.5.	Estimativa de idade	60
6.6.	Neuropsiquiatria	61
7.	Discussão e Conclusão	65
8.	Referências bibliográficas	71

I. Figuras

Figura 1 Os dois mecanismos epigenéticos mais bem estudados.....	11
Figura 2 Adição do grupo metil à posição 5' do anel de citosina.	12
Figura 3 Representação esquemática de um gene contendo ilha CpG.	13
Figura 4 Metilação de novo e manutenção da metilação	14
Figura 5 Diagrama de expressão bi-alélica e monoalélica	18
Figura 6 Herança de mutações imprinting	21
Figura 7 O nucleossoma e o código de histona	23
Figura 8 Acetilação do DNA.....	25
Figura 9 Métodos de detecção de metilação de DNA.....	30
Figura 10 Sequenciação por bissulfito	32
Figura 11 COBRA	34
Figura 12 MSP.	35
Figura 13 MSP em tempo real	36
Figura 14 Desenho de primers para MSP e MSP em tempo real.	37
Figura 15 Pirosequenciação	38
Figura 16 MassARRAY®.....	39

II. Tabelas

Tabela 1 Características dos métodos de detecção de metilação.	41
---	----

III. Siglas

ADP	Adenosina difosfato
AS	<i>Angelman syndrome</i> (Síndrome de Angelman)
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BIRC4BP	<i>BIRC4 binding protein</i>
CH ₃	Grupo metil
CH ₃ CO	Grupo acetil
Cm	Citosina metilada
CNV	<i>Copy number variations</i>
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
CpG	Dinucleótido citosina-guanina
Cry1	<i>Cryptochrome-1</i>
CTCF	<i>11-zinc finger protein</i>
DACT1	<i>Dapper Antagonist of Catenin 1</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
DMR	<i>Differentially methylated region</i> (região diferencialmente metilada)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNMT	<i>DNA-methyltransferase</i> (DNA metiltransferase)
DNMT1	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1</i>
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha</i>
DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta</i>
DNMT3L	<i>DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3-Like</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
GABA	<i>Neurotransmitter gamma-aminobutyric acid</i>
GRIA2	<i>Glutamate Receptor, Ionotropic, AMPA 2</i>
H19	<i>H19, Imprinted Maternally Expressed Transcript (Non-Protein Coding)</i>
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H3K27	Vigésima sétima lisina da histona 3
H3K4	Quarta lisina da histona 3
H3K9	Nona lisina da histona 3
H4	Histona 4
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i> (acetiltransferase)
HDAC	<i>Histone deacetylase</i> (desacetilase)
HMT	<i>Histone methyltransferase</i> (metiltransferases)
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>
HpaII	<i>Restriction enzyme</i>
HYMA	<i>[Fe] hydrogenase subunit HymA</i>
iDMR	<i>Inter-individual variation of DNA methylation</i>
IFG2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
iRNA	RNA de interferência
KCNQ1DN	<i>KCNQ1 downstream neighbor (non-protein coding)</i>
L81528	<i>L81528 tDMR</i>
LCN	<i>Low copy number</i>

LINE-1	<i>LINE-1 type transposase domain containing 1</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MAP	Metanfetamina
MBD	<i>Methylated DNA binding</i>
McrBC	<i>McrBC 5-methylcytosine restriction system component</i>
MECP2	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MSP	<i>Methylation-specific PCR</i>
ng	<i>Nanograma</i>
NotI	<i>NotI-like restriction endonuclease</i>
NPTX2	<i>Neuronal pentraxin II</i>
Pb ²⁺	Chumbo
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG3	<i>Paternally expressed 3</i>
Per1	<i>Period circadian clock 1</i>
PFN3	<i>Profilin 3</i>
pg	Picograma
PRMT2	<i>Protein arginine methyltransferase 2</i>
PWS	<i>Prader–Willi syndrome</i> (Síndrome de Prader-Willi)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
rNTP	<i>Ribonucleoside tri-phosphate</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SmaI	<i>Modification methylase SmaI</i>
SNRPN	<i>Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
tDMR	<i>Tissue specific differentially methylated regions</i> (região diferencialmente metilada de tecido)
TpG	Dinucleotido timina-guanina
TRIM58	<i>Tripartite motif containing 58</i>
UpG	Dinucleótido uracilo-guanina
USP49	<i>Ubiquitin specific peptidase 49</i>
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>

1. Introdução

A identificação humana através do estudo de DNA é uma importante ferramenta nos estudos forenses sendo aceite como prova na maioria dos processos judiciais em todo o mundo. O desenvolvimento de técnicas para a identificação afetou a vida de milhares de pessoas sendo utilizada rotineiramente na investigação criminal, testes de paternidade e identificação de indivíduos em desastres, atentados ou catástrofes.

Por outro lado, existem fenómenos que não são explicados apenas pela genética "clássica", como por exemplo, o facto de gémeos monozigóticos apresentarem frequentemente diferentes fenótipos e diferentes graus de penetrância de uma determinada doença [1]. O termo *epigenética* incorpora uma explicação parcial de ambos os fenómenos, tendo sido introduzido por Conrad Waddington em 1942, para definir mudanças reversíveis e herdadas no genoma funcional [2].

A hereditariedade da informação epigenética foi, durante muitos anos, limitada a divisões celulares. No entanto, é agora evidente que os processos epigenéticos podem ser transmitidos entre gerações [3, 4]. Este fenómeno foi descrito pela primeira vez em plantas e foi expandido para leveduras, rato e humanos [5, 6]. Assim, epigenética define-se pelo estudo de características mitoticamente transmissíveis, mas reversíveis, caracterizando-se por mudanças na expressão génica sem ocorrer mudança da sequência genómica, através da metilação do DNA, da estrutura da cromatina e outros.

Nos últimos anos, a epigenética despertou particular interesse na genética forense, pois a comunidade científica começou a procurar novas técnicas que permitissem a identificação humana com base nos fenómenos epigenéticos. Os eventos de metilação do DNA podem ser vistos como importantes marcadores epigenéticos sendo valiosos nos estudos forenses, especialmente em casos de investigações de paternidade [7-9], podendo ser um complemento útil para os marcadores genéticos clássicos, na identificação de tecidos [10-12] e fluidos [13], discriminação de gémeos monozigóticos [14-16], estimativa de idade [17-19], determinação da causa e circunstâncias de morte [20-23] e ainda associar diversos marcadores epigenéticos com doenças neuropsiquiátricas [24-26].

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo descrever as principais aplicações na área forense da análise de processos epigenéticos, em particular da metilação do DNA.

A metodologia do trabalho foi realizada a partir de revisão de literatura existente sobre o assunto.

2. Genética vs Epigenética

O DNA é a principal macromolécula que armazena informação genética, propagada através da linha germinativa. Assim, a partir de estudos genéticos prévios, surgiu o *dogma central* da biologia moderna. Este dogma engloba os processos envolvidos na manutenção e tradução da informação genética. As fases essenciais deste processo são (1) a auto-propagação de DNA por replicação semiconservativa, (2) a transcrição unidirecional, de 5' para 3', modelada pelo código genético (DNA), levando à formação de um intermediário de RNA mensageiro (mRNA); (3) tradução do mRNA para produzir polipéptidos constituídos por aminoácidos. Contudo, o *dogma central* engloba também a formação de DNA a partir de RNA pelo processo de transcrição inversa, seguida pela integração deste no DNA já existente (como demonstrado por retrovírus). Sabe-se que proteínas, conhecidas como priões, podem ser herdadas na ausência de um modelo de DNA ou RNA. Assim, estas proteínas especializadas têm propriedades que se assemelham a algumas propriedades de DNA, incluindo um mecanismo para a replicação e informação armazenada [27, 28].

A molécula de DNA é linear, com estrutura helicoidal dupla. Nos eucariotas superiores tem cerca de 2 metros de comprimento e, por isso, é maximamente condensada para se encaixar no núcleo de uma célula. A dupla hélice é composta por duas cadeias constituídas por nucleótidos. Cada nucleótido consiste num grupo fosfato, que lhe dá a característica ácida, um açúcar denominado desoxirribose e uma de quatro das bases nitrogenadas – adenina, guanina, citosina ou timina. Cada cadeia da molécula de DNA possui polaridade e direções opostas e por isso, são chamadas de antiparalelas. As bases nitrogenadas de cada cadeia são complementares em função da sua forma específica e carga elétrica; e ligam-se por pontes de hidrogénio.

Nos humanos, a informação genética está organizada em 23 pares de cromossomas. A sequência de DNA do nosso genoma constituída por bases dá origem a genes.

O invólucro de DNA em torno de um eixo de proteínas, chamadas histonas dá origem a uma repetição de polímero DNA-proteína conhecido como cromatina. A cromatina não é uniforme em termos de estrutura, existem vários modelos de armazenamento, desde um altamente condensado a um a menos compactado. A variação pode entrar na cromatina através da introdução de proteínas histonas incomuns (conhecidas

como variantes histonas), alteração de estruturas de cromatina (conhecido como remodelação cromatina), e a adição de sinalizadores químicos nas proteínas histonas (conhecido como modificações covalentes).

Diferentes fenómenos epigenéticos surgem pelo facto de o DNA não estar isolado, estando associado a várias moléculas como as proteínas. Formas distintas de cromatina surgem, no entanto, através de uma matriz de mecanismos covalentes e não covalentes que estão a ser descobertos de uma forma rápida. Isso inclui uma infinidade de modificações de histonas pós-tradução, energia dependente de cromatina que remodela etapas que mobilizam ou alteraram estruturas do nucleossoma, a dinâmica de novas variantes de histonas dentro e fora dos nucleossomas e o papel dos RNAs não codificantes. O DNA pode ser modificado covalentemente em muitos eucariotas superiores, por metilação. Evidências recentes sugerem que RNA não codificante pode sinalizar regiões especializadas do genoma em estados de cromatina mais compactada. Assim, a cromatina deve ser vista como um polímero dinâmico que potencia os sinais a partir do ambiente, determinando, em última análise, quais os genes que são ou não expressos [1].

A importância de ter um modelo de cromatina, que pode potenciar a informação genética, é que este proporciona camadas multidimensionais para a leitura do DNA. O desenvolvimento dos organismos multicelulares começa com um único genoma, no zigoto, para gerar mais de 200 tipos de células diferentes. Tem sido proposto que esta variação programada constitui um "código de epigenética" [29, 30]. Embora esta seja uma hipótese atrativa, é necessário um maior desenvolvimento científico para testar esta teoria. A principal função epigenética na diferenciação celular em mamíferos é quando células estaminais se tornam completamente diferenciadas durante a embriogénese. A epigenética surge como um ponto fulcral na genómica funcional revolucionando a genética molecular.

Assim, a *genética* é a ciência que estuda a forma como se transmitem as características biológicas de geração para geração enquanto a epigenética refere-se a alterações num fenótipo que não resultam de uma modificação na sequência do DNA do genoma da célula. Podem, contudo, ser estáveis e hereditárias, e serem provocadas por alterações ao nível do grau de metilação do DNA, da ativação da transcrição, do controlo da tradução ou de modificações pós-tradução.

A principal razão para a pesquisa epigenética relaciona-se com a regulação seletiva de um alelo dentro de um núcleo. A epigenética procura explicar, por exemplo, o que

distingue dois alelos idênticos, e como é esta distinção mecanicamente estabelecida e mantida através de gerações sucessivas de células e que diferenças observadas em gémeos monozigóticos não os tornam totalmente idênticos.

Os gémeos idênticos partilham a mesma sequência de DNA, e a sua identidade fenotípica é muitas vezes usada para realçar o poder da definição da genética. No entanto, os gémeos monozigóticos podem apresentar diferenças fenotípicas externas, provavelmente transmitidas por modificações epigenéticas que ocorrem durante a vida dos indivíduos [14].

No caso de regeneração de tecidos e do envelhecimento, ainda não é claro se estes processos são ditados por alterações no programa genético de células ou por modificações epigenéticas. A intensidade de pesquisa em escala global atesta o reconhecimento de que o campo da epigenética e é uma fronteira crítica de novo nesta era pós-genómica.

Além da sequência primária de DNA, a organização da cromatina exerce uma função chave na determinação de padrões de expressão génica: regiões menos compactadas da eucromatina são mais acessíveis à transcrição. Logo, a mesma sequência do gene pode ser expressa normalmente ou transcricionalmente silenciada dependendo da conformação da cromatina – eucromatina ou heterocromatina.

Os mecanismos de modificação do DNA constituem um conjunto de percursos interrelacionados, que estão na base da variação observada na cromatina [1]. Estas opções fornecem à cromatina um princípio organizador para genomas conhecido como *epigenética*. A epigenética envolve modificações relevantes, como a metilação do DNA e a modificação de histonas, os quais desempenham um papel significativo na regulação da expressão de genes, sem alterar a sequência do DNA.

Em suma, as alterações epigenéticas podem ser definidas como alterações na transcrição do gene através da modulação da cromatina, que não é provocada por alterações na sequência do DNA [14, 31].

Muitas destas modificações e alterações da cromatina são reversíveis e, por isso, não são suscetíveis de serem transmitidas através da linha germinativa. O padrão de epigenética parece ser herdado através de divisões celulares, proporcionando memória celular que pode prolongar o potencial de informação hereditárias do código genético; no entanto este padrão pode ser alterado durante a vida do indivíduo. Mudanças epigenéticas podem ser observadas em resposta ao meio ambiente e outros fatores como a dieta. O

termo *epigenoma* é um paralelo com a palavra *genoma* e refere-se ao estado global epigenético de uma célula [32].

Estas marcas transitórias são importantes porque impõem alterações no modelo de cromatina em resposta a estímulos intrínsecos e extrínsecos, e assim, regulam o acesso da maquinaria transcricional necessária para codificar o DNA.

A base molecular da epigenética é complexa e envolve principalmente alterações na ativação de genes específicos. Além disso, as proteínas de cromatina associadas ao DNA podem ser ativadas ou silenciadas e, por conseguinte assegurar que cada célula expresse apenas os genes necessários a uma determinada atividade [32].

3. Origens e evolução do conceito de Epigenética

Como as marcas epigenéticas são características adquiridas estabelecidas na vida de um organismo, e porque essas marcas são afetadas pelo ambiente, a herança de marcas epigenéticas na descendência assemelha-se à herança lamarckiana [1]. Para entender melhor o que inspirou o termo *epigenética*, este trabalho contempla uma breve revisão histórica no estudo das várias formas de herança genética, lamarckiana entre outras.

Lamarck, Darwin e Mendel

Em 1809, Lamarck (1744-1829) colocava em evidência o facto de a evolução acontecer devido à necessidade e não à seleção natural. Embora isto não ocorra, as experiências de Waddington e de outros no século XX demonstraram que a herança de algumas características fenotípicas é afetada pelo ambiente a que os pais estão sujeitos. Assim, o interesse no Lamarckismo aumentou recentemente, pois vários estudos no campo da epigenética colocam em evidência a possível herança de traços comportamentais adquiridos pela geração anterior [1].

Já em 1859, Darwin (1809-1882) defendia que a população apresenta uma variação aleatória de fenótipos e que os mais aptos sobreviveram e organismos menos aptos não sobrevivem o tempo suficiente para se reproduzirem, a designada seleção natural. Experiências recentes de epigenética, sugerem que o ambiente pode, de facto, ser capaz de transmitir partículas elementares para a linha germinativa e que essas partículas envolvem a metilação do DNA [33].

Herança mendeliana clássica (1865) de características fenotípicas resulta de diferenças alélicas causadas por mutações da sequência do DNA. Coletivamente, as mutações são a base da definição de traços fenotípicos, o que contribui para a determinação dos limites da espécie. Esses limites são, então, moldados pelas pressões da seleção natural, como explicado pela teoria da evolução de Darwin. Tais conceitos colocam as mutações no coração de genética clássica. Em contraste, a herança não mendeliana (por exemplo, a variação de crescimento embrionário, a coloração da pele mosaico, inativação aleatória de X) pode manifestar-se, como por exemplo, nas condições de hemizigotia no sexo masculino, para os genes localizados no cromossoma X. Quando

há ligação génica, diferentes pares de alelos também não obedecem à 2ª lei de Mendel. As leis de Mendel não se cumprem igualmente para os genes localizados nas mitocôndrias; quando há *imprint* genómico (fenómeno epigenético que ocorre em genes autossómicos, quando apenas um dos alelos é transcrito ativamente e o outro silenciado); quando há expressividade génica variável; quando ocorre interação entre os produtos codificados por diferentes genes ou por alelos diferentes de um mesmo gene, ou ainda por ação do meio a nível da expressão génica [28].

Os resultados de Mendel (1822-1884) caíram no esquecimento, até serem novamente publicados por Bateson, em 1901, a data que marcou o início da Genética Moderna. Assim, as leis de Mendel estão ainda sólidas e revolucionaram a biologia e as teorias evolucionistas [1, 33].

Em 1940, os biólogos evolucionistas desenvolveram uma teoria darwiniana moderna. Essa teoria combina teorias da evolução de Darwin com o modelo de herança mendeliana e rejeita outros modelos, tais como aqueles que incluem a herança de características adquiridas. A principal contribuição desta teoria foi a aplicação de análise estatística sofisticada e modelos complexos para a herança de características em populações de organismos. No entanto, em muitos aspetos, era muito restritiva pois eliminava qualquer papel ao ambiente na variação fenotípica. Nos modelos atuais de evolução, a importância do ambiente nas características adquiridas está novamente em voga por causa da epigenética [1].

Baldwin, Schmalhausen e Waddington

Baldwin (1861-1934) propôs que o meio ambiente é essencial à seleção evolutiva. No modelo de evolução de Baldwin, as novas mutações aliviam o *stress* e permitem que o organismo se reproduza de maneira ideal. O efeito Baldwin refere-se a comportamentos aprendidos que mais tarde se tornam instintos por mutações posteriores. Mas Baldwin queria que estas mutações incluíssem a herança de qualquer fenótipo [1].

Em 1943, Ivan Schmalhausen (1884-1963) propôs que uma população que vive no limite de sua tolerância, e em condições extremas em relação a qualquer aspeto de sua existência estará mais vulnerável a pequenas diferenças de qualquer outro aspeto. Ele

propôs que apenas pequenas alterações regulamentares decorrentes da variação genética na população são necessários para estabilizar a mudança no fenótipo [1].

Waddington (1905-1975) verificou muitos aspetos das teorias de Baldwin e Schmalhausen, através da realização de experiências. O objetivo de Waddington com a epigenética era fornecer percepções sobre interações gene-ambiente que influenciam o desenvolvimento e a embriologia. Waddington defendia que as alterações fenotípicas ocorrem de célula para célula durante o desenvolvimento de um organismo multicelular. Waddington mostrou que a assimilação genética de polimorfismos existentes numa população pode ocorrer ao longo de múltiplas gerações para gerar um fenótipo novo na ausência de novas mutações adicionais.

Para os biólogos modernos, o termo epigenética é geralmente definido como "herança não genética" [34]. Quem introduziu esta palavra no mundo científico foi Conrad Waddington, sendo, por isso referido como o “pai da epigenética”. A utilização deste termo por Waddington tinha, porém, como principal objetivo, descrever o desenvolvimento e adaptação de um organismo a um ambiente e os efeitos do ambiente no seu desenvolvimento [35].

Variação Genética

Robin Holliday em 1990 define a epigenética como o controlo temporal e espacial da atividade do genoma durante o desenvolvimento de organismos complexos [1].

Roth *et al.* [36, 37] propuseram que o genoma sofre continuamente amplificações aleatórias e contrações de grandes regiões. Se o gene mutado tem atividade parcial, a sua amplificação tem a vantagem de sobrevivência. De acordo com este modelo, há um aumento na frequência de mutação do gene mutado em comparação com a frequência de mutação do resto do genoma, não porque as mutações são dirigidos ao gene mutado, mas sim porque é amplificada 50 a 100 vezes.

Em 2004, Sebat *et al.* [38] demonstraram que o genoma humano também sofre uma elevada frequência de amplificação e contração de todo o gene e que este tipo de "mutação espontânea" pode explicar alterações fenotípicas, como por exemplo doenças como o autismo. Estas mutações espontâneas foram designadas por CNVs (*copy number variations*). Os CNVs podem incluir deleções, inserções e duplicações [39, 40].

Muitos especialistas em epidemiologia estão a explorar os efeitos transgeracionais, incluindo *imprinting* genómico. A ideia de herança transgeracional de características adquiridas remete para Lamarck no início do século XIX, mas apenas uma evidência correlativa existe em seres humanos. Hoje, no século XXI conhecem-se muitos fenómenos celulares epigenéticos e alguns que estão bem compreendidos ao nível molecular, tais como, o *imprinting* e a inativação do cromossoma X [1].

A epigenética é às vezes citada como uma explicação para as diferenças nos traços externos, traduzindo a influência do ambiente, dieta e potencialmente outras fontes externas para a expressão do genoma [31]. Determinar que componentes são afetados ao nível molecular, e como as alterações nesses componentes afetam a biologia humana e as doenças humanas, são grandes desafios para futuros estudos.

Nos últimos anos, investigadores introduziram uma versão moderna do conceito epigenética: *nature vs nurture*, em que *nature* diz respeito ao controlo total de quem somos apenas pela genética, e *nurture* é o contrário, é a ideia que o nosso ambiente determina quem somos [1]. Isto surge porque somos, obviamente, uma mistura dos dois termos.

Muitos investigadores, dentro do contexto *nature vs nurture*, defendem que fatores externos como o ambiente são os principais estimuladores de mudanças epigenéticas. Alguns pensam que o *imprinting* atua principalmente através dos genes reguladores que por sua vez tem um efeito de cascata através de outros efeitos que variam, como a ingestão de alimento da mãe [1]. Outros autores defendem que o estabelecimento e manutenção de estados epigenéticos é um processo flexível e vulnerável [41], que os fatores ambientais (como poluição, nutrição e estilo de vida) influenciam a dinâmica epigenéticas do oócito na avó materna e mãe, possivelmente causando alterações no genótipo/fenótipo nos netos [42].

4. Mecanismos epigenéticos

O dois mecanismos epigenéticos mais bem estudados são a metilação do DNA e a modificação de histonas (figura 1) [34].

Os processos epigenéticos têm sido descritos no contexto do desenvolvimento, porque tem um papel crítico na diferenciação celular durante a embriogénese [43]. Estudos recentes indicam que alterações epigenéticas podem também surgir ao longo da vida devido a influências ambientais ou mudanças estocásticas [44]. Uma vez que os mecanismos epigenéticos são mitoticamente transmissíveis e integrantes da transcrição e do funcionamento genómico, estas mudanças dinâmicas ocorrem durante períodos chave do desenvolvimento, o que pode ter alguma influência no fenótipo e suscetibilidade a doenças [44].

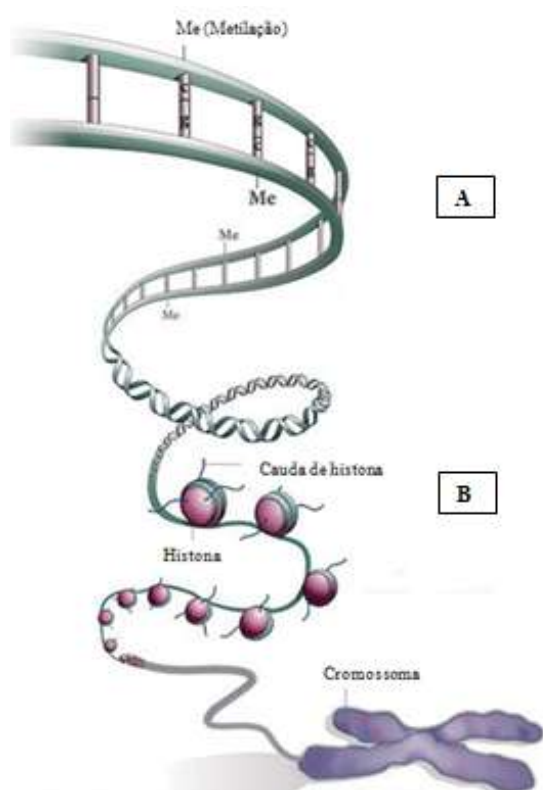


Figura 1 Os dois mecanismos epigenéticos mais bem estudados: A - metilação do DNA; B - modificação de histonas.

Adaptado de <http://sciblogs.co.nz/code-for-life/files/2010/08/epigenetics-400px.png> acedido a 11/01/2012.

4.1. Metilação do DNA

Os padrões de metilação de DNA são os mais estudados e melhor entendidos entre os mecanismos epigenéticos.

A metilação do DNA é um evento epigenético que afeta mecanismos celulares através da mudança de expressão gênica [45]. Trata-se de uma modificação geneticamente programada no DNA dos mamíferos e tem um papel importante no desenvolvimento e diferenciação celular, o que permite às células manterem diferentes características através do controle e modulação da expressão dos genes a partir da estrutura da cromatina [46, 47].

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais antigo, associado à repressão de genes. Este mecanismo consiste na ligação covalente de um grupo metil ($-\text{CH}_3$) ao DNA. Nos eucariotas, a citosina é a base mais frequentemente metilada, originando-se a 5-metilcitosina (figura 2). Este processo envolve a transferência de um grupo metil para a posição 5' do anel de pirimidina da citosina (C) de um dinucleótido citosina-guanina (CpG - p significa a ligação fosfodiéster 3'-5' entre C e G). Esta reação é catalisada e mantida por um grupo de enzimas designadas DNA metiltransferases (DNMTs)[48].

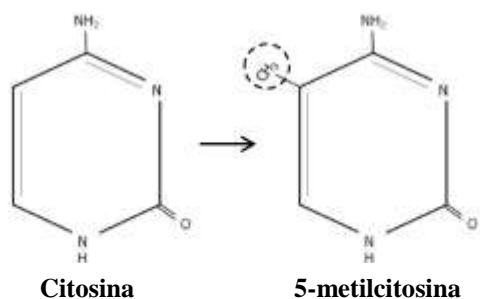


Figura 2 Adição do grupo metil à posição 5' do anel de citosina.
Adaptado de Vidaki *et al.* [32].

Aproximadamente metade dos genes dos mamíferos tem as chamadas ilhas de CpG em regiões promotoras que podem ser metiladas diferencialmente [49], embora a metilação diferencial de genes que não têm ilhas CpG possa ser mais importante [49]. Nos humanos, 70-80% dos CpG existentes no genoma estão metilados [47]. Alguns animais, como a *Drosophila*, aparentemente perderam a metilação CpG na sua linhagem evolutiva. Nestes organismos, as modificações de histonas são, presumivelmente, a marca epigenética mais importante [50].

Numa célula "normal" as ilhas CpG das regiões promotoras não se encontram metiladas (com exceção dos genes *imprinted* e da maioria dos genes do cromossoma X inativo nas mulheres), permitindo a expressão de um conjunto de genes necessários ao tipo celular em causa, na presença dos fatores de transcrição adequados. Os restantes dinucleótidos CpG espalhados pelo genoma apresentam-se, normalmente, metilados, sendo este padrão de metilação do DNA conservado através das divisões celulares. A ausência de metilação destes dinucleótidos é observada apenas em células estaminais embrionárias [32].

A metilação do DNA geralmente inibe a expressão genética (ver figura 3), provavelmente por afetar a estrutura da cromatina [51], no entanto em alguns casos está associada a ativação do gene.

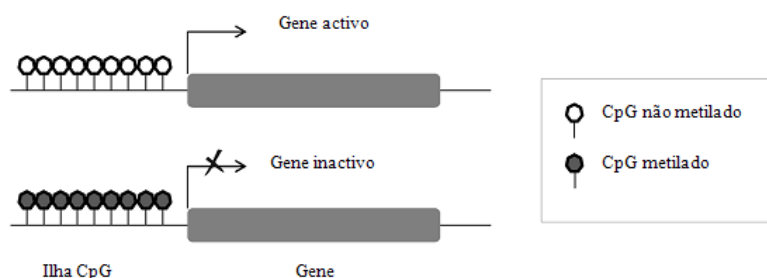


Figura 3 Representação esquemática de um gene contendo ilha CpG. Na maioria dos casos, quando CpG está não metilado permite a expressão do gene; contudo, quando é metilado o gene torna-se inativo, não é expresso.

Adaptado de Vidaki *et al.* [32].

O mecanismo pelo qual a metilação afeta a expressão do gene está pouco esclarecido e sabe-se que em diferentes tecidos existem diferentes formas de metilação [52]. A metilação das citosinas e a alteração da estrutura da cromatina constituem formas importantes de modificar o DNA e, dessa forma, influenciar a expressão génica de uma forma estável. Estas modificações são de natureza epigenética já que não se baseiam na alteração da sequência do DNA. A maioria das mudanças epigenéticas é feita em genes reguladores, tendo um efeito em cascata noutros genes [1].

As formas de metilação do DNA são suscetíveis a mudanças em resposta a estímulos ambientais como a dieta e o *stress*, e são muito vulneráveis a alterações durante o desenvolvimento inicial intrauterino. A metilação da ilha CpG atua de forma a quebrar as ligações dos fatores de transcrição e atrair proteínas de ligação metil que iniciam a condensação da cromatina e o silenciamento genético [48]. Uma vez que as citosinas

metiladas são passíveis da desaminação espontânea, os dinucleótidos CpG são menos comuns no genoma. Pensa-se que os genes com regiões promotoras não dependem da metilação do DNA para o controlo da sua expressão porque as regiões promotoras não são metiladas independentemente do nível de expressão. A metilação *de novo* de uma região de um promotor é um fenómeno raro durante o envelhecimento de tecidos somáticos normais.

A metilação do DNA destas ilhas CpG tem sido alvo de estudos epigenéticos e está associada com a remodelação da cromatina e a redução da expressão de genes próximos [53]. A metilação do DNA que ocorre fora das ilhas CpG (aproximadamente 70% do total de CpGs) tem também um papel importante na regulação genómica, particularmente durante o desenvolvimento.

As três principais DNMTs (DNA metiltransferases) são a DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT1 é responsável pela preservação/manutenção do padrão metilação; a preservação que ocorre aquando da replicação celular, pois reconhece o DNA metilado, modulando as funções de ativar ou desativar a expressão génica e a metilação *de novo*, que ocorre no início do desenvolvimento embrionário e estabelece novos padrões de metilação. Assim, a metilação do DNA é um processo herdado mitoticamente devido à ação da DNMT1. As metiltransferases DNMT3A e 3B estão ativas na metilação que ocorre *de novo*, em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia. Além destas três, ainda existe a DNMT3L que é responsável por identificar sinais no genoma da necessidade de metilação (figura 4)[54-56].

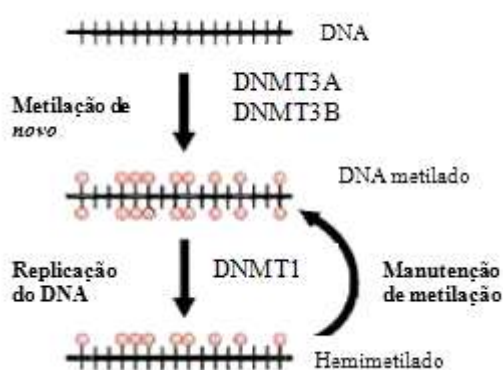


Figura 4 Metilação de novo e manutenção da metilação. DNA não metilado fica metilado *de novo* através de enzimas DNMT3A e DNMT3B. Adaptado de Allis, *et al.* [1].

As desmetilases são o grupo de enzimas responsável pela desmetilação do DNA. O processo denominado de desmetilação ativa parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas a perturbações ambientais. A desmetilação ainda pode ser passiva quando não há envolvimento de desmetilases e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativa durante o ciclo celular. Assim, o nível e o padrão de 5-metilcitosina são determinados por ambos os processos de metilação e desmetilação, e as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas [1].

A metilação das bases citosina poderá interferir ao nível da transcrição na ligação de fatores de transcrição do DNA. Um mesmo gene pode apresentar diferentes níveis de metilação em diferentes células de um ser multicelular, consoante esse gene esteja ou não a ser transcrito, apresentando hipermetilação nas células cuja diferenciação não implica a sua transcrição. A hipometilação corresponde a um estado em que a transcrição é ativa, enquanto a hipermetilação corresponde à inibição da transcrição. Assim, o grau de metilação das bases citosina (5-metilcitosina) das regiões promotoras de genes que estão a ser transcritos influencia a sua expressão: quanto mais metilado estiver um gene, menor será o seu nível de expressão [33].

A metilação é um mecanismo epigenético envolvido na diferenciação celular e na transformação neoplásica. Fatores ambientais como os folatos, a colina, a metionina e a vitamina B12 promovem a hipermetilação, enquanto o etanol e os hidrocarbonetos aromáticos promovem a hipometilação [1].

A metilação das citosinas pode funcionar como um mecanismo mutagénico espontâneo, já que as moléculas de 5-metilcitosina podem desaminar e sofrer mutação na timina. Efetivamente, mais de um terço de todas as mutações pontuais responsáveis por doenças humanas têm origem na alteração CpG para TpG (dinucleótido timina-guanina).

Logo após a replicação do DNA, o padrão de metilação da nova cadeia é objeto de manutenção cuidada pela célula, dado que não se encontra metilada. Assim, pouco tempo após a replicação, esta cadeia é metilada por ação de uma metiltransferase de manutenção que adiciona os radicais metilo aos locais CpG da cadeia recém-sintetizada correspondentes aos locais metilados na cadeia de DNA que serviu de modelo de replicação [57]. Pode-se referir que a metilação do DNA é mantida ao longo da replicação do DNA de forma semi-conservativa.

Embora os padrões de metilação do DNA possam ser transmitidos de uma célula para outra, eles não são permanentes. De facto, as alterações nos padrões de metilação de DNA pode ocorrer durante toda a vida de um indivíduo. Algumas modificações podem ser uma resposta fisiológica a alterações ambientais ou a processos patológicos, como a transformação oncogénica ou envelhecimento celular. No entanto, os fatores intrínsecos e ambientais que induzem alterações de metilação do DNA permanecem desconhecidos.

Em determinadas circunstâncias a metilação mutagénica do DNA é benéfica, quando, por exemplo, protege o genoma de elementos transposões [1]. Transposões são sequências de DNA capazes de se movimentar de uma região para a outra no genoma da célula.

As marcas epigenéticas são essenciais para a diferenciação de células tronco embrionárias [58], inativação do cromossoma X e o *imprint* parental [59]. Sendo os dois últimos baseados na metilação e por isso referidos de seguida. Também estão envolvidas no cancro e doenças autoimunes [60]. Mudanças epigenéticas anormais são influenciadas pela idade [61], vírus [62], dieta [63], fatores ambientais [64] e cancro [65].

Regiões metiladas diferencialmente em tecidos específicos

Uma vez que as formas de metilação são estabelecidas através da diferenciação celular e se manifestam em condições normais, fornecem aos vários tecidos e células um perfil de metilação único e específico de cada célula e tecido [66]. Sabe-se que o padrão de metilação varia entre indivíduos e entre tecidos do mesmo indivíduo. A ampla análise de metilação do DNA no genoma é também indicadora da existência de numerosas regiões metiladas diferencialmente em tecidos específicos (tDMRs - *tissue-specific differentially methylated regions*) no genoma dos mamíferos [67-69]. A identificação de novos tDMRs específicos de tecidos e fluidos corporais é necessária para o desenvolvimento de novos métodos de identificação destes, para aplicações forenses. O conhecimento de tDMRs também pode ser útil para compreender a metilação aberrante em algumas doenças.

Metilação interindividual e intraindividual

Alguns estudos anteriores reportaram a metilação do DNA de um tecido específico usando um número limitado de tecidos de diferentes sujeitos [70, 71]. Os tecidos nestes estudos foram obtidos a partir de vários sujeitos, e assim é impossível determinar a variação da metilação do DNA intraindividual, isto é, entre tecidos do mesmo indivíduo. A variação da metilação interindividual, entre vários indivíduos, foi reportada em regiões genómicas específicas, incluindo transposões, genes *imprinted* e cromossomas X inativos, o que permitiu o conhecimento da análise de metilação do DNA para identificar variações intra e interindividual [12].

Byun *et al.* [12] analisaram a metilação 1505 dos dinucleótidos CpG em 11 órgãos de 6 autópsias. Ao contrário de outros estudos, neste pode-se analisar a metilação diferencial entre tecidos (tDMRs) e entre indivíduos (iDMRs) porque foram recolhidos vários tecidos do mesmo indivíduo. Identificaram diferentes genes metilados entre tecidos e entre indivíduos, observando que os padrões de metilação intraindividual exibem uma variação superior à metilação interindividual, o que é consistente com os diferentes padrões de metilação dos tecidos. Concluíram que os padrões de metilação são mais consistentes entre o mesmo tipo de tecidos de diferentes indivíduos do que entre diferentes tecidos do mesmo indivíduo.

Woodfine *et al.* [72], com o seu estudo observaram grande estabilidade da metilação do DNA em todos os DMRs (regiões diferencialmente metiladas) da linha germinativa e em todos os DMRs somáticos de origem paterna (que mantiveram um nível de metilação entre 35%-65% em todos os tecidos somáticos, independentemente da expressão génica). A metilação dos DMRs somáticos de origem materna mostrou maior variação no padrão de metilação entre os tecidos. Contudo, a maioria dos DMRs, mostrou alguma variabilidade nos níveis de metilação intraindividual no sangue periférico, sugerindo a necessidade de mais estudos para determinar e conhecer mais que um DMR por tecido para conhecer processos epigenéticos estáveis num tecido.

Imprinting

O fenómeno *imprinting* parental ou genómico foi descoberto há quase 30 anos em mamíferos [1]. O *imprinting* é um exemplo de herança epigenética e de expressão monoalélica (figura 6) que ocorre em genes autossómicos, quando apenas um dos alelos é transcrito ativamente e o outro silenciado. Neste processo, alguns genes autossómicos têm padrões de herança incomuns [73].

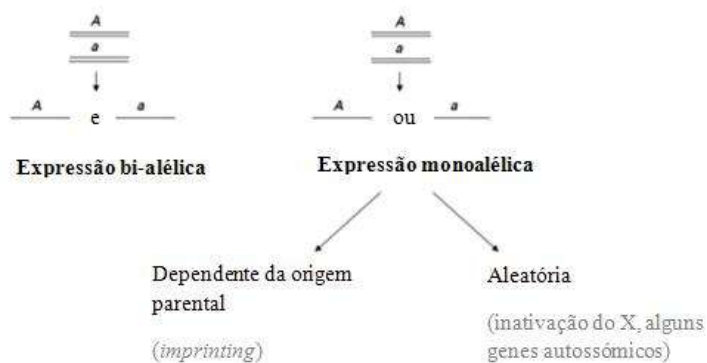


Figura 5 Diagrama de expressão bi-alélica e monoalélica. Os dois alelos de um gene são designados “A” e “a”. A expressão monoalélica ocorre quando apenas um alelo é transcrito. Qual dos dois alelos é transcrito depende da origem parental ou pode ser uma seleção aleatória. Adaptado de Singer-Sam *et al.* [73].

De acordo com os conceitos clássicos da genética mendeliana, um gene comporta-se do mesmo modo, independentemente do sexo do progenitor através do qual foi herdado pelo descendente. No entanto, apesar de este conceito continuar a ser verdadeiro para muitos caracteres genéticos, cerca de 1% dos genes humanos estão sujeitos a *imprinting* genómico. Ao contrário do proposto nas leis mendelianas, nas quais a herança de ambos os pais contribuirá na expressão génica, o *imprinting* genómico é caracterizado por alterações no DNA que produzem diferentes fenótipos dependendo da origem parental do alelo. Embora a transmissão dos alelos sujeitos a *imprinting* obedeça as leis de Mendel, a sua expressão fenotípica não é mendeliana, pois o fenótipo pode ser afetado em termos de expressividade, idade de início ou natureza dos sintomas.

O *imprinting* consiste numa marcação epigenética de natureza reversível, que inibe a expressão de um alelo em gerações sucessivas, em função do sexo do progenitor que o transmite. Cria haploidia funcional localizada num *locus*. É um processo biológico que

ocorre naturalmente nas células de diversos organismos e pode ser definido como uma marcação bioquímica que ocorre de forma diferenciada entre os alelos parentais durante a gametogênese. Isto é, um dos genes do par de alelos de um *locus* tem expressão diferente do outro gene desse *locus*, em função do sexo do progenitor de que foi herdado (origem paterna ou materna). Ou seja, designa-se por *imprinting* materno o processo em que a inativação do alelo tem origem no progenitor do sexo feminino e *imprinting* paterno se a inativação ocorre no alelo transmitido pelo progenitor masculino. Como consequência, o contributo paterno e materno para o genoma do zigoto (em termos funcionais) pode não ser equivalente, provavelmente devido a graus de metilação diferentes [73].

Este é um processo epigenético que está associado a várias etapas. Logo após a fertilização, as células separam-se e originam as células germinativas. Mas esta marcação epigenética é removida antes de se formarem as células germinativas, onde ambos alelos vão ser reprogramados de acordo com o sexo do feto [74, 75]. O *imprinting* é um processo reversível pois o padrão de metilação não é uma mutação ou uma mudança permanente, mas envolve modificações bioquímicas diferentes em cromossomas de origem materna e paterna. É efetuada a marcação do DNA dos gametas parentais, a manutenção dessa marca durante o desenvolvimento embrionário e nos tecidos somáticos adultos e o reajuste da marcação no início da gametogênese do novo indivíduo. Além disso, está associado à inativação funcional de regiões da cromatina a partir da metilação de ilhas CpG presentes nas zonas diferencialmente metiladas dos dois alelos (paterno e materno). Estas marcas são transmitidas pelos gametas para o embrião durante a fecundação. O *imprinting* genómico levará, portanto, a uma expressão diferenciada dos alelos paternos e maternos durante o desenvolvimento do novo indivíduo.

Os genes que sofrem *imprinting* evidenciam regiões ricas em C-G com metilação diferenciada. Cada *locus imprinted* possui pelo menos uma região diferencialmente metilada (DMR), que apresenta um alelo parental específico metilado e contribui para a expressão do gene *imprinted*. Uma vez estabelecidos, os DMRs, são mantidos durante o desenvolvimento. Estes DMRs podem ser de origem paterna ou materna e apresentam diferenças se a metilação for adquirida na linha germinativa ou após a fertilização e estão presentes em vários locais com diferente densidade de CpG e de CTCF (*11-zinc finger protein*) [72]. Os DMRs podem ser classificados em DMRs da linha germinativa ou DMRs somáticos. Os da linha germinativa são os *loci* que apresentam diferente metilação no

espermatozoide e no óvulo. E esta diferença é mantida após a fertilização. Nos DMRs somáticos a metilação é de origem parental mas adquirida após fertilização [72].

Como foi referido anteriormente, a inibição da expressão génica, a nível da transcrição, é devida à ligação de um radical metil a bases citosina, na região reguladora do gene. Os genes que sofrem *imprinting* evidenciam, caracteristicamente, regiões ricas em CG com metilação diferenciada. A metilação ocorre durante a gametogénese e mantém-se estável durante as divisões mitóticas, atingindo apenas algumas regiões cromossómicas específicas. A metilação específica do DNA de origem parental está *imprint* num *locus* e fornece forma de determinar o gene obrigatório sem recorrer à análise genealógica, em casos de paternidade. No *locus imprinted*, o alelo materno e paterno são metilados de forma diferente [73].

Em relação a alguns genes verifica-se inclusive que o *imprinting* ocorre apenas em algumas fases do desenvolvimento ou apenas em alguns tecidos do organismo, fazendo deste mecanismo uma forma muito particular de regulação da expressão génica. Como exemplo refira-se o gene de comundongo IGF2, expresso em múltiplos tecidos embora tenha expressão bi-alélica em órgãos como o cérebro e o fígado adulto, ou o gene WT1 (associado ao tumor de Wilms quando mutado) com *imprinting* paterno (expressão monoalélica de origem materna) presente em células da placenta e do cérebro, mas com expressão bi-alélica no rim. O gene IGF2 é expresso apenas se for herdado do pai, verifica-se um *imprinting* materno pois a cópia do gene derivada da mãe é inativa.

São exemplos de doenças que apresentam *imprinting* genómico, a síndrome Prader-Willi (PWS), Angelman (AS), Beckwith-Wiedeman, distrofia miotónica entre outras.

O *imprinting* de uma região no cromossoma 15, origina o PWS ou AS. Nos pacientes PWS, ambas as cópias do gene SNRPN, situado no cromossoma 15, são inativos. É uma doença multissistémica, caracterizada por atraso mental, disfunção hipotalâmica, hipotonia, entre outras disfunções. A principal alteração genética da SPW, presente em aproximadamente 75% dos pacientes, é a deleção do segmento 15q11-13 de origem paterna, já em 25% dos casos de SPW são encontradas dissomias maternas do cromossoma 15 (ambos os cromossomas 15 presentes no indivíduo são de origem materna). A associação entre dissomia e a existência de síndrome indica a presença de *imprinting* em genes localizados na região 15q11-q13 [76].

No PWS a deleção ocorre no cromossoma herdado do pai, enquanto no Angelman a deleção é encontrada exclusivamente no cromossoma de origem materna. Assim, os pacientes PWS tem perda parental e os de Angelman materna. A inativação destes genes (por deleção ou *imprinting*) será responsável pelas alterações observadas nesta síndrome (ver figura 6).

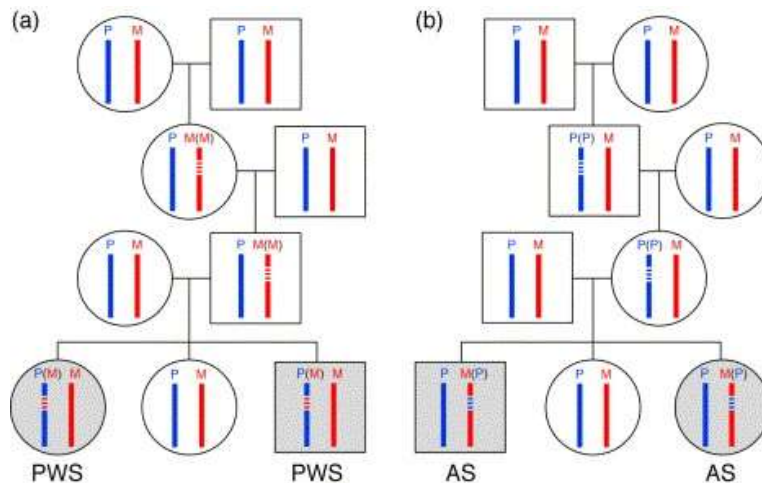


Figura 6 Herança de mutações *imprinting*. A herança do cromossoma 15 *imprinted* (epigenótipo) em células somáticas está representando em círculos nas mulheres e quadrados nos homens. (a) PWS: se a mutação surge na linha germinativa de um ancestral feminino [M(M)]. Como é um *imprinting* materno é transmitido silenciosamente (fenótipo normal) à geração seguinte. No entanto, no homem, a mutação bloqueia o *imprinting* materno, e o cromossoma paterno com o *imprinting* materno [P(M)] é transmitido. Por conseguinte, 50% das crianças que herdam apenas o *imprinting* materno, e assim desenvolvem o PWS. (b) AS: se a mutação surgir no cromossoma paterno [P(P)], esta pode ser transmitida silenciosamente aos homens. A mulher transmite o cromossoma materno com o *imprinting* paterno [M(P)], desenvolvem AS, ocorrendo em apenas 50% das crianças.

Fonte: Nicholls, *et al.* [76].

Inativação do cromossoma X

O tipo de expressão monoalélica mais bem estudado é a inativação do cromossoma X. As mulheres têm duas cópias do cromossoma X, no entanto a maioria dos genes de um dos cromossomas estão inativos em todas as células, por isso este processo ocorre em todas as células das mulheres [73].

Nas fases precoces do desenvolvimento embrionário, um dos cromossomas X das mulheres é inativado aleatoriamente nas células somáticas, mediante um processo descrito por Mary Lyon em 1961 e, por isso, designado lionização.

A inativação do X é um tipo de compensação de expressão de gene. O cromossoma inativo corresponde ao corpúsculo de Barr que aparece condensado e geneticamente

inativo nos núcleos das células somáticas. A cromatina sexual é considerada um exemplo de heterocromatina facultativa. Nos humanos, os cromossomas sexuais X e Y determinam o sexo de um indivíduo - as mulheres têm dois cromossomas X (XX), os homens têm um cromossoma X e um Y (XY). Todos os genes no cromossoma Y são necessários para o desenvolvimento do sexo masculino, enquanto os genes no cromossoma X, são necessários para o desenvolvimento tanto do sexo masculino e do sexo feminino.

Nas mulheres com mais de dois cromossomas X apenas um é inativado. Como as mulheres recebem dois cromossomas X, herdam duas cópias de muitos dos genes que são necessários para o desenvolvimento normal. Cópias extras de genes ou cromossomas podem afetar o desenvolvimento normal. Um exemplo é a síndrome de Down, que é causada por uma cópia extra de parte ou da totalidade do cromossoma 21. Na inativação do cromossoma X, um dos cromossomas X, escolhido ao acaso, fica inativo, para garantir o número correto de genes que são expressos, e para impedir o desenvolvimento anormal. Nos indivíduos do sexo masculino com mais do que um cromossoma X, verifica-se igualmente inativação dos cromossomas X excedentários.

Assim, este processo funciona como um mecanismo de regulação da dosagem génica restringindo a um cromossoma X a disponibilidade funcional para codificação, com exceção das pequenas regiões pseudo-autossómicas, seja no homem ou na mulher. Doutro modo, haveria o dobro dos alelos disponíveis na mulher quando comparada com a hemizigotia masculina [1].

O mecanismo molecular subjacente à inativação do cromossoma X é a metilação de citosina. A inativação de um dos cromossomas conduz a um estado de condensação da cromatina designado por heterocromatina funcional. Caracteriza-se por variar em diferentes tipos de células e durante a fase precoce do desenvolvimento embrionário. O cromossoma inativado é de replicação tardia na fase S do ciclo mitótico pelo que este processo é um importante modelo de estudo da epigenética [1].

4.2. Modificação de histonas

A estrutura da cromatina tem funções essenciais como condensar e proteger o DNA, preservar a informação genética e controlar a sua expressão [77]. As histonas são proteínas carregadas positivamente que se ligam ao DNA carregado negativamente, são essenciais para o acondicionamento do DNA no núcleo e tem um papel importante na regulação da expressão génica.

No núcleo das células eucarióticas, os cromossomas são organizados na forma de cromatina, que é composta por DNA, RNA e proteínas. Os nucleossomas são as unidades básicas da cromatina. O nucleossoma compreende um dos componentes principais de regulação epigenética do gene correspondendo à estrutura onde a cromatina se enrola com as histonas. Existem quatro tipos de histonas – H2A, H2B, H3, H4 – associadas à forma octâmérica dos nucleossomas, como ilustra a figura 7 [78], e estes estão associados a uma molécula externa ao nucleossoma, a H1 [79].

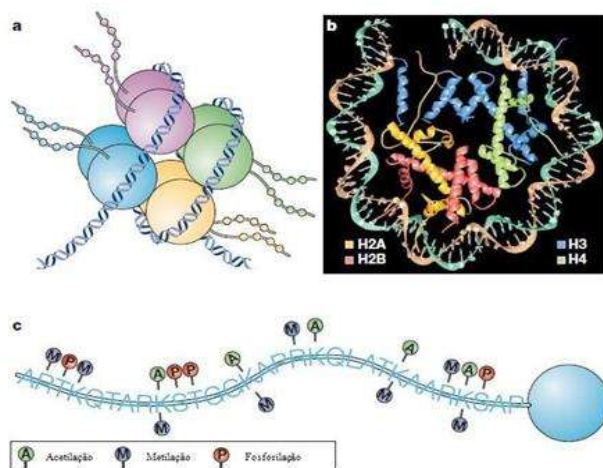


Figura 7 O nucleossoma e o código de histona. a) Cada nucleossoma compreende um octâmetro de histonas, que consiste num tetrâmero H32-H42 e dois dímeros H2A-H2B. Os N-terminais dos aminoácidos de histonas projectam para fora do nucleossoma e interagem com o DNA do núcleo. Estas caudas de histona podem ser epigeneticamente modificadas. b) Estrutura cristal do nucleossoma descreve a interacção do DNA com as histonas. c) Estão ilustrados os primeiros 30 aminoácidos da cauda N-terminal da histona H3 humana. Muitos locais podem ser alvo de modificação epigenética, como por exemplo, acetilação, metilação e fosforilação.

Adaptado de Levenson, *et al.* [86].

As histonas apresentam extremidades aminoterminais que se projetam do nucleossoma, chamadas de caudas das histonas. As caudas das histonas consistem em 15-30 aminoácidos nas regiões N-terminais das quatro histonas e na região C-terminal de

H2A. As caudas N-terminal das histonas estendem-se para fora do nucleossoma e são alvo de modificações epigenéticas [78].

Essas caudas estão sujeitas a algumas modificações epigenéticas já conhecidas como acetilação e metilação de lisina e arginina, ubiquitinação de lisina e fosforilação de serina.

Algumas destas modificações covalentes ocorrem em resíduos específicos, e juntas constituem o “código histona”, modulando a expressão do gene através de alterações da estrutura da cromatina [80, 81]. Estas mudanças dinâmicas e muitas vezes hereditárias têm efeitos profundos sobre a regulação espacial e temporal da expressão gênica alterando a disponibilidade da região reguladora a fatores de transcrição. Estas modificações pós-traducionais nas histonas são capazes de alterar a carga da molécula da proteína, e como resultado, são potencialmente capazes de modificar as propriedades funcionais dos octâmeros, estando relacionadas com o grau de compactação dos nucleossomas. Estas alterações afetam o acesso de fatores de transcrição do DNA. A cromatina condensada (heterocromatina), na qual o DNA e as histonas estão muito juntas, bloqueia o acesso de fatores de transcrição e outros iniciadores da expressão genética, e por isso está associada à repressão da transcrição, isto é, à menos transcrita. Por outro lado, uma conformação aberta da cromatina (eucromatina) permite o acesso dos fatores de transcrição e a sua iniciação [82]. As marcas epigenéticas estão associadas aos dois tipos de cromatina.

Acetilação e Fosforilação

A acetilação de histonas é a mais investigada das modificações de histonas, sendo um mecanismo de estímulo à transcrição. A acetilação ocorre nas quatro histonas, tendo como principal alvo as lisinas. Uma histona acetilada significa uma cromatina menos compactada, portanto mais acessível aos fatores de transcrição, pois a adição de acetil à lisina neutraliza as lisinas positivas e diminui a atração entre as histonas e o DNA (ver figura 8).

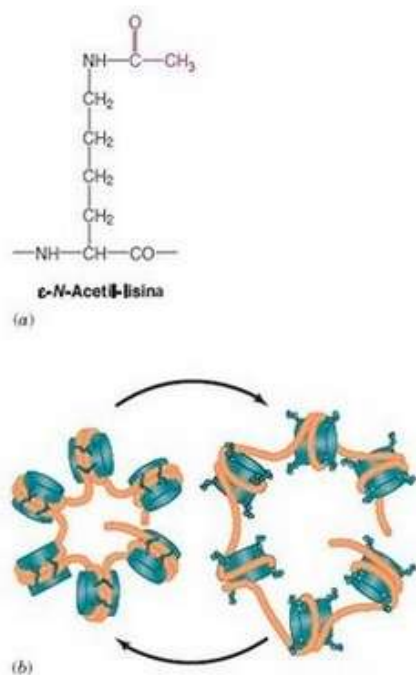


Figura 8 Acetilação do DNA. (a) A acetilação ocorre resíduos de lisina na extremidade N-terminal de histonas. (b) A modificação das lisinas por acetilação substitui as cargas positivas por grupos acetil neutros, e enfraquece a interação eletrostática entre o núcleo octâmico e o DNA. Esse processo é reversível, e a acetilação e desacetilação de histonas é um modo de alargar ou apertar a estrutura da cromatina.

Fonte: <https://sites.google.com/site/biotecnologia3bioq/controlodaexpres%C3%A3ogen%C3%A9tica2232> acessado a 10/08/2013.

Várias acetiltransferases de histonas (HATs) foram descritas como catalisadores da adição de um grupo acetil (CH_3CO) aos resíduos lisina das cadeias laterais dos octâmeros de histonas. Estas modificações de histonas neutralizam a cauda N-terminal das proteínas carregadas positivamente, tornando a molécula de DNA com mais carga negativa disponível para a maquinaria de transcrição. As HATs funcionam como coativadores da transcrição, sendo o seu efeito final a facilitação do acesso às regiões promotoras da transcrição. As desacetilases de histonas (HDACs) têm função oposta às HATs, removendo os grupos acetil e causando repressão da transcrição, visto que a cromatina fica mais compactada dificultando o acesso dos fatores de transcrição ao DNA. Acredita-se que as HDACs são recrutadas como parte do complexo de repressão por metilação do DNA. Assim, a remoção de grupos acetil catalisada por a HDAC condensa cromatina em torno de promotores de genes geralmente resultando em diminuição da expressão do gene [1, 33].

A fosforilação é outra modificação pós-traducional que tem consequências importantes para a compactação da cromatina e também um papel importante na mitose (ciclo celular) e apoptose.

Metilação de Histonas

A metilação de histonas está envolvida no controle da expressão génica de mamíferos e relacionada com a formação da heterocromatina, podendo ser reversível. Além disso, a metilação do DNA e as modificações em histonas estão correlacionadas.

Byun *et al.* [12] verificou que o estado de metilação da histona H3, que sugeriu que a metilação do DNA pode estar associada ao código de histonas específicas.

Sabe-se que a metilação nas histonas contribui para direcionar as DNA metiltransferases a metilar o DNA onde estas histonas se localizam, e a metilação do DNA pode servir como padrão para algumas das modificações em histonas, após a replicação do DNA. A metilação de histonas é promovida por algumas metiltransferases que tem como alvo determinados resíduos de arginina e de lisina nas histonas, particularmente a histona H3. A metilação da H3 permite a ligação da HP1 (*Heterochromatin protein 1*), o que silencia o gene. A metilação de arginina nas histonas está relacionada com a ativação da transcrição; entretanto, a metilação de lisina está relacionada com a repressão da transcrição. Assim, o padrão de metilação das histonas influencia a metilação do DNA, contribuindo para uma menor ou maior compactação da cromatina, respetivamente [1].

A metilação das histonas pode induzir quer um estado repressivo transcricional quer um estado facilitador, dependendo do resíduo de aminoácido a ser metilado. Por exemplo, enquanto a metilação da quarta lisina da histona 3 (H3K4) geralmente aumenta a expressão do gene, a metilação de lisinas 9 (H3K9) ou 27 (H3K27) da histona 3 geralmente produz o efeito oposto. Assim, a metilação de histonas pode ativar ou silenciar o gene. O silenciamento dos genes é afetado pela adição de grupo metil a citosina, ou pela perda de grupos acetil a lisinas nas histonas. Geralmente, os dois processos são simultâneos, intensificando o enrolamento do DNA em nucleossomas e alterando a forma espacial e forças físicas do DNA.

Ribosilação

Relativamente à alteração da estrutura da cromatina, deve-se ter presente o efeito da poli-ADP ribosilação das histonas. As proteínas histónicas H1, H2B e lamina B, uma vez ribosiladas perdem a afinidade para o DNA, devido à carga altamente negativa dos polímeros de ADP-ribose [81]. Assim, este processo pode constituir uma forma relativamente simples de desfazer a ordem mais elevada de organização da cromatina, de modo a facilitar o acesso dos fatores de transcrição às sequências reguladoras da expressão génica.

As modificações da cromatina agem de forma coordenada e ordenada para regular os processos celulares como a transcrição, replicação e reparo do DNA. De facto as alterações epigenéticas são, em contraste com as alterações genéticas, reversíveis, e tem implicações importantes para o tratamento do cancro humano, pois aberrantes modificações de histonas são potenciais alvos moleculares para a intervenção terapêutica em doenças malignas humanas.

Embora se estude a metilação de DNA e a modificação de histonas em separado, muitas vezes eles interagem; e aparentemente a classificação de mecanismos epigenéticos em termos de ativação ou supressão do gene é demasiado simplista [83]. A proteína de ligação metil MECP2, por exemplo, liga-se especificamente a citosinas metiladas, atraindo histonas desacetiladas, que são histonas hipoacetiladas. Um estudo recente mostrou que resíduos de histona H3 não metilados na lisina 4 recrutam metiltransferases, resultando na metilação *de novo* [84]. Além de catalisar a reação de metilação do DNA, as DNMTs também interagem com HDACs e metiltransferases de histonas (HMTs) para alterar a estrutura da cromatina e assim a expressão génica [53].

4.3. Outros processos epigenéticos

RNA não codificante

Foram descobertas novas funções para as moléculas de RNA, tanto na regulação como na resistência a vírus através de um mecanismo designado por RNA de interferência (iRNA) [85]. Este processo é desencadeado por pequenas moléculas de RNA provenientes de RNA viral, de sequências codificadas no genoma (microRNA) ou de sequências de mRNA parcialmente digeridas. A presença destas pequenas moléculas de RNA geram pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA) capazes de silenciar programas genéticos inteiros e de mediar a resistência a vírus. Assim, a ação do RNA não codificante está relacionada com o silenciamento pós-transcricional de genes através do mecanismo de interferência de RNA onde ocorre o bloqueio da tradução ou degradação do RNA mensageiro alvo. Além da ação bloqueadora da transcrição, o RNA de interferência pode estar associado à metilação de sequências de DNA. A perturbação genética do iRNA leva ao relaxamento da heterocromatina em torno dos centrómeros o que provoca uma expressão errada de transcrições normalmente silenciosas e uma diminuição de metilação de histona H3 [86].

Priões

Os priões podem influenciar os processos epigenéticos independentemente do DNA e da cromatina, pois são capazes de mudar a sua estrutura de uma forma autocatalítica o que pode influenciar a expressão epigenética [1].

Todos os mecanismos referidos anteriormente parecem estar interligados para a organização estrutural da cromatina tornando-a mais acessível ou não a fatores de transcrição.

As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente. Qualquer alteração ambiental, ataque de patógenos, tipo de alimentação pode acarretar mudanças epigenéticas. O *stress* ambiental também é um determinante na ocorrência de variações epigenéticas.

5. Metodologias de determinação da presença de metilação

Uma vez que a metilação é o processo epigenético mais bem estudado, nesta secção irão ser descritas e analisadas metodologias empregues no estudo desse processo.

Estão disponíveis vários métodos para análise de metilação do DNA. É importante conhecer as características de cada técnica, incluindo a quantidade necessária de DNA, a flexibilidade de escolha de locais CpG a analisar, o tipo de metodologia (quantitativa ou qualitativa), a sua complexidade e o seu custo [33].

Por exemplo, se se pretende analisar a metilação do DNA como uma causa de silenciamento do gene, deve ser analisado uma região específica que controla a expressão do gene [87], e deve ser usado um método com flexibilidade de seleção da região a analisar. Por outro lado, quando a análise é feita no âmbito de um diagnóstico médico deve ser adotado um método de alta precisão.

Os métodos de deteção de metilação propostos incluem: a modificação química de resíduos de citosina não metilados, interação de proteínas com 5-metil-citosina (Cm) e a metilação sensível a enzimas de restrição. No entanto, em certos casos, e dependendo do objetivo do estudo, pode recorrer-se a combinação de técnicas [32].

5.1. Metilação sensível a enzimas de restrição

Na análise de metilação podem ser usadas enzimas de restrição, cuja atividade de clivagem depende da metilação de um sítio CpG na sua sequência alvo. Este método explora as variações encontradas em sequências de DNA que são alvos de clivagem por enzimas de restrição. A grande maioria das enzimas de restrição sensíveis à metilação, tais como *HpaII* e *SmaI*, são inativas em locais CpG metilados, mas apenas uma enzima de restrição é sensível à metilação, a *McrBC*, pois é inativa em locais CpG não metilados (figura 9). A clivagem diferencial pode ser detetada por hibridação *Southern-Blot*.

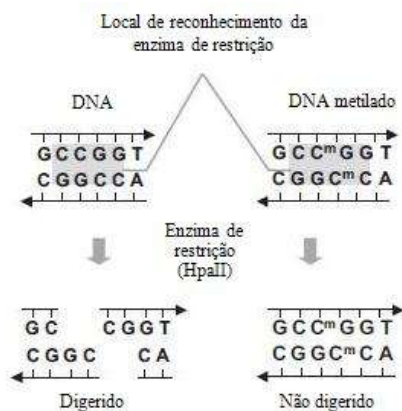


Figura 9 Métodos de detecção de metilação de DNA. Detecção por enzimas de restrição sensíveis à metilação. O DNA genômico é digerido com uma enzima sensível à metilação, a enzima de restrição (HpaII nesta figura) quando o seu local de restrição (CCGG) é não metilado, mas quando o local é metilado não é digerido. Se o DNA genômico é digerido ou não representa o estado de metilação do DNA original. Cm significa citosina metilada.

Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

Esta técnica é simples e robusta mas a incompleta digestão ou diferenças de atividade enzimática podem dificultar a análise e afetar a interpretação. A principal desvantagem, relacionada com a utilização de enzimas de restrição, é a dependência da disponibilidade de sequências de reconhecimento específico de enzimas que flanqueiam a CpG local de interesse [32].

Esta técnica é especialmente útil para análise de sequências repetitivas porque múltiplas sequências semelhantes no genoma podem ser analisadas por uma única sonda. Por outro lado, esta técnica analisa apenas um número limitado de locais CpG localizados no interior de locais de reconhecimento de enzimas de restrição, e requer uma grande quantidade de DNA de alta qualidade. Embora esta técnica fosse frequentemente usada antes das técnicas baseadas na conversão por bissulfito, atualmente caiu em desuso [33].

No estudo de Zhao *et al.* [7], foi selecionada como modelo para o sistema proposto um SNP (polimorfismo de DNA que corresponde à substituição de um único nucleótido), responsável pela codificação de uma proteína denominada de proteína N, que se encontra metilado quando herdado da mãe e não metilado quando herdado do pai. A proteína N é codificada pela família de genes humanos denominados de SNRPN (*Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*). Essa família de genes é expressa numa ampla gama de tecidos somáticos sendo responsável pela codificação de proteínas que estão envolvidas no processamento do pré-mRNA e nos mapas para regiões de menor supressão do cromossoma 15q11-q13, os quais estão envolvidos na Síndrome de Prader-Willi (SPW).

Este estudo também demonstrou que a presença de metilação no alelo materno do gene responsável pela proteína N é capaz de inibir a ação de uma determinada enzima de restrição que é capaz de clivar a região apenas na ausência de metilação, ou seja, quando o alelo é de origem do pai. A referida enzima é chamada de *NotI* e encontra seu sítio de restrição a 16 pares de bases a jusante do SNP e é justamente essa proximidade do sítio de restrição da enzima *NotI* com o sítio de clivagem para a região polimórfica SNP que permitiu a utilização de uma técnica de PCR capaz de identificar a origem parental do alelo. A abordagem proposta no trabalho combina o uso da enzima de restrição sensível a metilação com a técnica de PCR. Quando o DNA é digerido inicialmente com a enzima, a amplificação da molécula de DNA com os iniciadores que flanqueiam o sítio de restrição só ocorrerá caso a clivagem do DNA pela enzima tenha sido impedida pela metilação do local [7]. Os autores não aconselham o uso de uma quantidade inferior a 500 ng de DNA de modo a minimizar o risco de detecção de falsa metilação através digestão incompleta pela enzima de restrição específica de metilação. Neste estudo foi utilizada uma das técnicas de biologia molecular mais comuns em laboratório, o PCR RFLP, que serve para complementar os estudos de SNPs. Esta metodologia foi aplicada em amostras de rim, pulmão, coração, fígado, músculos, cérebro, pele, sangue periférico e espermatozoides. A possibilidade de utilizar diferentes tipos de amostra reflete no poder da técnica, facilitando sua utilização nos mais diferentes casos. Os testes de identificação a partir do padrão de metilação analisado no estudo foram realizados em 32 crianças heterozigotas e, em 18 delas, foi possível realizar a identificação de forma consistente confirmando-se a tese dos autores de que o *status* de metilação dos alelos está correlacionado com a origem parental dos mesmos [7].

Byun *et al.* [12] identificou vários SNPs ou elementos repetitivos de DNA, que podem interferir com a medição exata da metilação do DNA. Isto acontece pois os SNPs são um polimorfismo devido à substituição de um único nucleotídeo e a metilação do DNA pode ser confundida com um polimorfismo pelo equipamento de detecção.

5.2. Modificação química de resíduos de citosina não metilados

5.2.1. Conversão por bissulfito

O processo de conversão de DNA por bissulfito leva à desaminação de citosinas não modificadas, mas como resultado a 5-metilcitosina é protegida; as citosinas que resistem ao tratamento de bissulfito são portanto identificadas como metiladas. A conversão da citosina não metilada em uracilo (U) é rápida, enquanto a conversão da citosina metilada é lenta. Depois de conversão de DNA mediada por bissulfito, as cadeias de DNA deixam de ser complementares.

A citosina e a timina do local CpG do DNA convertido mostram o DNA metilado e não metilado respectivamente, no DNA original. Esta técnica permite-nos investigar o estado de metilação de todos os locais CpG entre os *primers*, e como múltiplos locais CpG numa única molécula de DNA estão metilados. A correta determinação de um padrão de metilação específico é altamente dependente da completa conversão de resíduos de citosina não metilados [32].

Na sequenciação por bissulfito o DNA convertido por bissulfito é amplificado por PCR utilizando *primers* localizados nas regiões do genoma sem locais CpG. O produto da PCR é então sequenciado, geralmente após a clonagem, e os locais CpG dentro da região amplificada são examinados (figura 10).

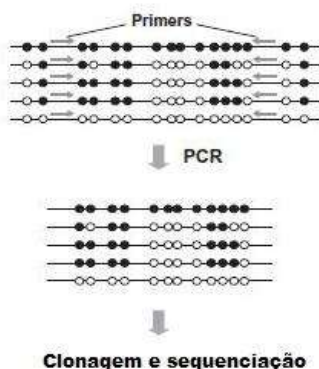


Figura 10 Sequenciação por bissulfito. O DNA convertido por bissulfito é amplificado por PCR com os *primers* que se localizam em locais sem CpG. O produto de PCR depois é clonado, e os clones são individualmente sequenciados. Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

Dependendo das condições de temperatura de PCR pode haver um desvio que conduz à não amplificação preferencial do DNA metilado. Na maioria dos casos o DNA não metilado é preferencialmente amplificado, mas o metilado pode ser amplificado com a utilização de *primers* específicos. Para evitar esta distorção dever ser estabelecida uma temperatura de *annealing* ótima e um conjunto de *primers* específicos. Os ciclos excessivos de PCR podem causar a desnaturação do produto na ausência de atividade da *taq* polimerase e produzir a amplificação de produtos inespecíficos, e também podem exagerar na diferença de eficiência de produto de DNA metilado e não metilado [33].

A metilação do DNA de quase qualquer região pode ser analisado usando este método, isto é, trata-se de um método fiável para testar todas as citosinas de uma região do genoma. Não obstante esta é uma técnica que implica um trabalho intensivo, requerendo pelo menos dez clones por amostra para ser sequenciada.

Esta técnica deve ser feita para obter resultados imparciais. Devido à sua alta resolução e identificação positiva de citosinas metiladas, este é o método de escolha para análise de padrões de metilação do DNA, embora a análise minuciosa de grandes regiões seja demorada, como anteriormente referido.

Vários métodos baseados em PCR que dependem do tratamento por bissulfito foram desenvolvidos para acelerar a análise de regiões de interesse. Estes métodos são altamente úteis, mas concentram-se apenas em alguns locais CpG de uma região do DNA, sacrificando a informação detalhada que seria revelada por sequenciação por bissulfito. O corrente desafio da sequenciação do genoma inteiro por bissulfito provavelmente será resolvido no futuro próximo. No entanto, pode nem sempre ser desejável ou necessário ter informação sobre o estado de metilação de todos os locais CpG no genoma humano haplóide [33].

Uma vez que a diferença do estado de metilação é convertida numa sequência diferente de DNA, esta pode ser detetada por várias técnicas, tais como a sequenciação, já referida, PCR por metilação específica (MSP - *Methylation-specific PCR*), MSP em tempo real, análise de restrição combinada com bissulfito (COBRA - *Combined Bisulfite Restriction Analysis*), pirosequenciação (*Pyrosequencing*) e análise MassARRAY® [33].

No contexto da análise forense, o tratamento com bissulfito parece ser o mais adequado, pois a integridade do DNA é mantida e a quantidade de material de DNA necessário é relativamente baixa. Procedimentos alternativos também podem ser sensíveis

a compostos inibitórios, comumente encontrados em casos forenses. Isto é muito importante porque as amostras forenses são frequentemente de baixa qualidade e quantidade ou degradadas. Em tais casos, a identificação e estudo de metilação do DNA representa um grande desafio, no entanto, avanços recentes permitem a sensível detecção da metilação de DNA em vários locais CpG de menos de 1 ng de DNA a partir de pequenas quantidades de fluidos corporais [32].

5.2.1.1. COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*)

A técnica COBRA é baseada no aparecimento ou desaparecimento do local de reconhecimento da enzima de restrição após a conversão por bissulfito [88] (figura 11).

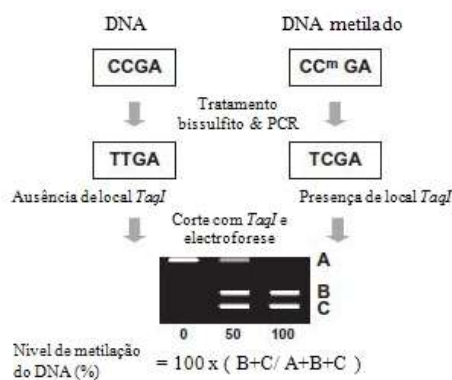


Figura 11 COBRA. DNA convertido por bissulfito é amplificado por PCR com *primers* que se localizam em locais sem CpG, e o produto de PCR é digerido com uma enzima de restrição (*TaqI* nesta figura). No ensaio COBRA mostrado aqui, se a citosina no local CpG é metilado, o sítio de restrição permanecerá. Por outro lado, se o local for não metilado, o sítio de restrição desaparecerá. A análise quantitativa dos níveis de metilação é conseguida através de eletroforese em gel e medição subsequente das bandas clivadas e não clivadas.

Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

Ao quantificar a proporção de produtos de PCR digeridos e não digeridos, a proporção de DNA metilado e não metilado pode ser quantificada. Esta técnica é adequada para a detecção quantitativa do nível de metilação de um local CpG, e tem a vantagem de ser uma técnica de fácil execução.

Uma vez que vários locais CpG dentro de uma pequena região genómica são coordenadamente metilados ou não [89, 90], a análise de um único local de CpG pode prever o estado de metilação da região circundante. Uma desvantagem é que os locais CpG que podem ser analisados por COBRA são limitados.

Recentemente, foi desenvolvido um protocolo modificado de COBRA, o Bio-COBRA que incorpora um passo de eletroforese do produto de PCR digerido de um chip de microfluidos, tal como o *Bioanalyzer* e fornece uma avaliação rápida e quantitativa da metilação do DNA num grande conjunto de amostras [91].

5.2.1.2. MSP (*Methylation-specific PCR*)

O MSP examina o *status* de metilação de CpG de vários *primers* para realização de PCR com *primers* específicos para sequências metiladas ou não, observando-se a presença ou ausência de um produto de PCR (figura 12) [92].

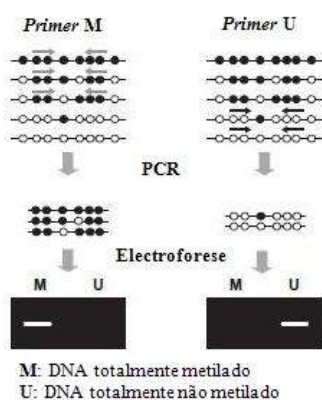


Figura 12 MSP. Vários padrões de metilação de CpGs dentro das sequências de *primers* são examinados pela realização de PCR com *primers* específicos para DNA metilado ou não metilado e faz-se a monitorização da presença ou ausência de um produto de PCR. Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

Se ambas as regiões dos *primers forward* e *reverse* são metiladas, os locais CpG são também susceptíveis de serem metilados, pelo que as moléculas de DNA com um padrão de metilação mosaico nos *primers* não são amplificadas. Esta técnica tem uma elevada flexibilidade na seleção de uma região do genoma para análise porque os *primers* da PCR podem ser concebidos em posições arbitrárias, ainda que a região analisada seja rica em CpG, é tecnicamente simples e de baixo custo. Ao mesmo tempo, a MSP pode produzir facilmente resultados falsos negativos e falsos positivos. Por isso, é extremamente importante usar um número ótimo de ciclos de PCR e de temperaturas de *annealing* com controlos negativos apropriados [33].

Xu *et al.* [93], recomenda um método modificado, mais eficiente de que a sequenciação por bissulfito, em amostras de um micro volume de sangue seco. Após o

tratamento com bissulfito, o DMR materno *imprinted* do gene SNRPN foi investigado utilizando MSP e sequenciamento direto.

5.2.1.3. MSP em tempo real e *MethyLight*

A MSP em tempo real é realizada por detecção em tempo real de produtos MSP. Ao comparar a amplificação de amostras de teste com amostras padrão que contêm números conhecidos de moléculas de DNA, o número de moléculas de DNA metilado e não metilado pode ser quantificado (figura 13).

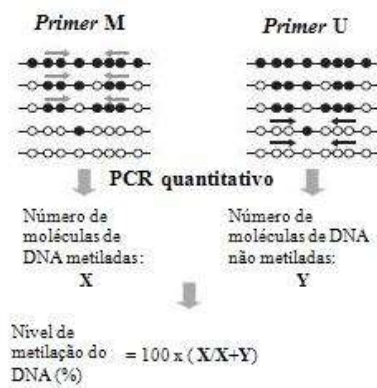


Figura 13 MSP em tempo real. O número de moléculas de DNA metilado e não metilado são quantificadas por MSP em tempo real. Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

O nível de metilação pode ser calculado com base no número de moléculas de DNA. Os produtos de PCR podem ser detetados por um corante de intercalação como o SYBR GREEN® (MSP em tempo real) ou por uma sonda *TaqMan* (*MethyLight*) [94]. Uma vez que a sonda *TaqMan* hibridiza apenas com uma determinada sequência (sequência desnaturada ou não metilada), o *MethyLight* tem maior especificidade do que a MSP quantitativo embora a sonda *TaqMan* seja mais dispendiosa.

O corante de intercalação pode detetar ainda de forma inespecífica DNA amplificado e dímeros de *primers*, tornando a confirmação da amplificação específica por análise de *melting* do produto de PCR essencial. Foi reportado que a utilização de um novo corante fluorescente, como o SYTO-82, pode produzir resultados mais precisos quando se analisa a curva de *melting* [95]. A curva de *melting* indica o ponto correspondente à temperatura de

dissociação dos primers específicos das sequências alvo que estão a ser testadas, por isso a especificidade da reação pode ser verificada pela análise da curva de *melting*.

A MSP em tempo real e *MethyLight* têm muita flexibilidade na escolha da região genómica a analisar, assim como a MSP, e são precisos e sensíveis para quantificar níveis de metilação do DNA.

A MSP em tempo real oferece uma avaliação precisa, sensível e quantitativa dos níveis de metilação. Para maximizar estas vantagens a região do genoma a analisar deve ser cuidadosamente selecionada, e os *primers* específicos para o DNA metilado e não metilado devem ser desenhados na mesma região. A extremidade 3' do *primer* deve ser num local rico em C/T e os vários locais CpG devem ser localizados perto dessa extremidade (figura 14).

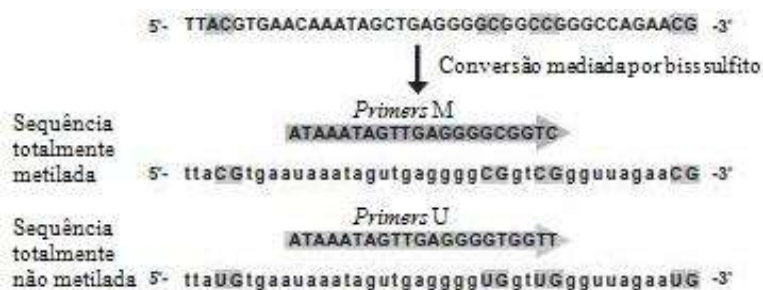


Figura 14 Desenho de *primers* para MSP e MSP em tempo real. *Primers* específicos para DNA metilado e não metilado (*primers* U e M, respetivamente) devem conter vários locais de CpG e nas suas extremidades 3'.

Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

A temperatura de *annealing* e a concentração de magnésio deve ser otimizada utilizando controlos de DNA metilado e não metilado. No MSP em tempo real as melhores condições de amplificação podem ser determinadas pela curva de amplificação e *melting*.

Enquanto a curva de amplificação, em condições ótimas, mostra um aumento acentuado num ciclo de PCR e um *plateau*, a curva de *melting* sob condições ótimas mostra um único pico acentuado.

Para quantificar os níveis de metilação do DNA por MSP em tempo real é necessário um padrão com um número conhecido de moléculas de DNA, que pode ser preparado de duas formas. Em primeiro, o produto de PCR pode ser purificado através de uma coluna de filtração em gel para remover os nucleotídeos e *primers* não utilizados. Em segundo, o produto de PCR por MSP é clonado num plasmídeo e este é linearizado com uma enzima de restrição. Uma vez que o peso molecular do produto de PCR ou do

plasmídeo com a inserção pode ser calculado, o número de moléculas de DNA numa solução pode ser calculado.

A MSP e MSP em tempo real podem atingir uma alta sensibilidade, pois permitem a detecção de uma molécula de DNA metilada entre 1000 moléculas. No entanto, a perda substancial do número de moléculas de DNA que podem servir de molde de PCR é realizada durante a conversão por bissulfito. Ou seja, embora o peso de DNA diminua apenas ligeiramente, o número de DNA molde medido por PCR quantitativo diminui para 5 a 10% antes do tratamento por bissulfito [33].

5.2.1.4. Pirosequenciação

A pirosequenciação deteta os níveis de metilação de CpG em locais individuais de um produto de PCR obtido por *primers* comuns às sequências metiladas e não metiladas após a conversão por bissulfito. A quantidade de C e T nos locais individuais convertida em valores de pirofosfatos libertados usando o método de extensão do *primer* e as suas quantidades são precisamente quantificadas (figura 15).

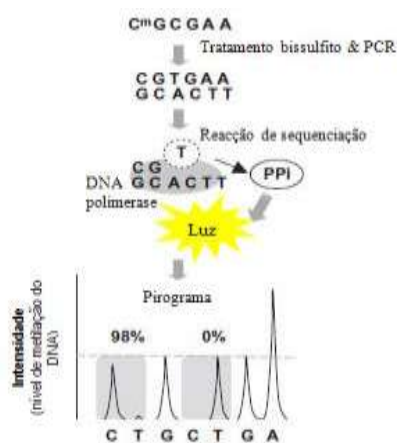


Figura 15 Pirosequenciação. Polimorfismos C/T do produto de PCR são investigados por medição de pirofosfato libertados em locais individuais. A quantidade de pirofosfato é convertida num sinal de luz, e, em seguida, revelada num programa. Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

As vantagens desta técnica são os seus resultados quantitativos precisos e a simplicidade de utilização. No entanto, o desenho de *primers* adequados é difícil, dependendo do local de sequência, e é necessário um instrumento projetado especificamente para esta análise [33].

Woodfine *et al.* [72] utilizou a pirosequenciação para avaliar os níveis de metilação em genes *imprinted*.

Paliwal *et al.* [96] propôs um método que envolve a amplificação ampla do genoma por bissulfito e detecção de metilação por pirosequenciação utilizando quantidades muito baixas de DNA (100 pg). A amplificação ampla do genoma pode ultrapassar a limitação do uso de quantidades diminutas do DNA, no entanto, uma boa qualidade e quantidade de DNA permanece neste teste.

5.2.1.5. MassARRAY®

Esta técnica detecta os níveis de metilação de CpG em locais individuais de um produto de PCR utilizando *primers* comuns às sequências metiladas e não metiladas após a conversão por bissulfito. Nesta técnica a PCR é realizada com um *primer reverse* acoplado a um promotor T7. O produto de PCR é transcrito *in vitro* utilizando um único análogo de dNTP (desoxirribonucleótido fosfatado), o que pode ser substituído pela sua rNTP (*ribonucleoside tri-phosphate*). O transcrito *in vitro*, em seguida, é clivado pela RNase A que digere em bases de pirimidina, de um modo específico (figura 16).

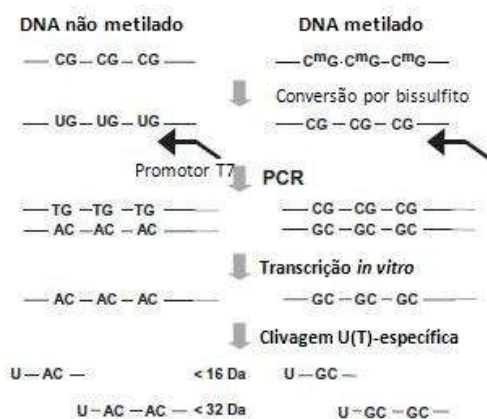


Figura 16 MassARRAY®. O produto de PCR amplificado a partir de DNA convertido por bissulfito é transcrito *in vitro*, e clivado pela RNase A. A diferença na massa de um produto com o C, e com T (16 Da) é detectada por MALDI-TOF (espectrometria massa). Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

Se dCTP (*Deoxycytidine triphosphate*) foi usado durante a transcrição *in vitro*, a RNase A quebra em todos os uracilos. A diferença na massa do produto com C e com T

(16Da) é detetado pela matriz assistida por laser disorção/ionização de tempo de sedimentação (MALDI-TOF) espectrometria de massa.

A MassARRAY® é uma técnica poderosa para investigar quantitativamente o padrão de metilação de CpG em vários locais de um grande número de amostras, mas tem a desvantagem do elevado custo do equipamento [33].

De seguida apresenta-se uma tabela comparativa dos vários métodos de deteção de metilação após conversão por bissulfito.

Tabela 1 Características dos métodos de detecção de metilação.
Adaptado de Tollefsbol *et al.* [33].

	<i>Quantidade de DNA</i>	<i>Flexibilidade de escolha da região a analisar</i>	<i>Tipo de metodologia</i>	<i>Facilidade de uso</i>	<i>Custo</i>	<i>Aplicação</i>
Sequenciação	Pequena	Alta	Qualitativa	Intermédia	Baixo	Análise de padrões de metilação em moléculas de DNA
COBRA	Pequena	Baixa	Quantitativa	Fácil	Baixo	Deteção de DNA metilado/não metilado em locais CpG específicos
MSP	Pequena	Alta	Qualitativa	Fácil	Baixo	Deteção de DNA metilado/não metilado em regiões específicas
MSP em tempo real usando SYBR Green I®	Pequena	Alta	Quantitativa	Fácil	Baixo	Análise quantitativa de moléculas de DNA metiladas/não metiladas de regiões específicas
MethyLight	Pequena	Muito alta	Quantitativa	Fácil	Intermédio	Análise quantitativa de moléculas de DNA metiladas/não metiladas de regiões específicas
Pirosequenciação	Pequena	Alta	Quantitativa	Intermédia	Alto	Análise quantitativa de metilação de múltiplos locais CpG
MassARRAY®	Pequena	Alta	Quantitativa	Fácil	Alto	Análise quantitativa de metilação de múltiplos locais CpG

5.3. Interação de proteínas com 5-metilcitosina

As citosinas metiladas podem ser especificamente reconhecidas por um anticorpo anti-metilcitosina ou por uma proteína de ligação de DNA metilado (MBD - *methylated DNA binding*). Depois do corte adequado do DNA, o DNA metilado pode ser coletado através de métodos de afinidade. A curta duração destes fragmentos é crucial para atingir uma resolução suficiente, melhorando a eficiência de análise, bem como reduzindo os efeitos do comprimento do fragmento [32]. Tais técnicas podem ser combinadas com a PCR, no entanto, deve ser atenção com a quantidade de DNA utilizado pois o excesso pode resultar num PCR com falsos positivos. Este princípio é usado principalmente em técnicas de triagem do genoma [97].

Em contraste com o tratamento com bissulfito, os métodos baseados em proteínas mantêm a estrutura de bases do DNA; no entanto, estes não têm alta especificidade e sensibilidade. Por exemplo, o método de detecção de metilação do DNA por imunoprecipitação é uma técnica de purificação em larga escala que é utilizada para enriquecer as sequências de DNA metilado. Este método consiste principalmente em isolar fragmentos de DNA através de um anticorpo monoclonal criado contra a citosina metilada.

6. Aplicações forenses

A análise de DNA em contexto forense não pode, por si só, provar a culpabilidade do criminoso ou a inocência do mesmo, no entanto, pode estabelecer uma ligação entre o suspeito e a cena do crime. Atualmente a identificação humana por DNA já é aceite em processos judiciais em todo o mundo, sendo possível a identificação de pessoas mortas há décadas utilizando-se DNA obtido a partir de ossos ou dentes [98].

Contudo há limitações nas técnicas que envolvem o estudo direto do DNA e foi com o foco nesses casos que muitos investigadores passaram a procurar novas técnicas que permitissem a identificação humana com base nos fenómenos epigenéticos, ou seja, baseados nos processos que alteram o fenótipo do indivíduo, mas que não estão associados a mudanças na sequência do DNA como é o caso da metilação do DNA.

Devido às limitações encontradas nas técnicas já utilizadas, estão a ser levado a cabo estudos com o objetivo de desenvolver uma técnica que permita determinar a origem parental com base em fenómenos epigenéticos, sendo o padrão de metilação do DNA de um indivíduo é um dos processos que melhor caracteriza a alteração do fenótipo do indivíduo, mas que não está associado a mudanças na sequência de DNA [7, 99].

Assim, os eventos de metilação do DNA podem ser vistos como importantes marcadores epigenéticos sendo valiosos nos estudos de genética forense, especialmente em casos de identificação de paternidade, podendo ser um complemento útil para os marcadores genéticos clássicos como os microssatélites [7].

Como mencionado anteriormente, o epigenoma age como um interface entre o genoma e o ambiente, e pode mudar de acordo com as necessidades específicas de uma célula. Portanto, o padrão de metilação do DNA pode revelar a atividade de genes dentro de um determinado tecido a um determinado momento. Do ponto de vista forense, a análise de padrões de metilação do DNA pode dar dicas sobre estados patológicos, discriminação de gémeos monozigóticos [16], as circunstâncias que conduzem à morte [100] ou o tipo de tecido [11]. Noutros estudos a epigenética também tem sido proposta como uma nova ferramenta para a determinação da idade exata de um dador de DNA [18].

Marcadores epigenéticos com aplicação forense

Tendo em conta que o DNA é uma molécula estável, as análises da sequência são mais vantajosas sob o ponto de vista forense. Não obstante, em determinados contextos existe interesse em estudar outras moléculas e eventos moleculares. Os ensaios baseados na utilização de marcadores epigenéticos podem ser muito benéficos numa variedade de aplicações forenses em comparação com várias proteínas ou métodos baseados em RNA. No entanto, é necessário cuidado extra na seleção de locais de CpG, bem como a interpretação dos perfis de metilação observados.

O primeiro passo num ensaio epigenético bem sucedido é a identificação de marcadores de metilação de DNA adequados. Existem duas abordagens diferentes na seleção de locais CpG, o primeiro envolve conhecimentos aprofundado das regiões candidatas, como as ilhas CpG de promotores de genes, enquanto o segundo emprega análise para a descoberta de biomarcadores epigenéticos numa escala de todo o genoma [101]. Numa análise de metilação do DNA do genoma é muito provável descobrir muitas regiões genómicas novas que apresentam variações epigenéticas, incluindo aquelas que estão localizadas fora de promotores de genes. Por outro lado, este aumento na escala da pesquisa traz grandes desafios ao nível de tratamento de dados (bioinformática e estatística), que têm vindo a ser resolvidos utilizando métodos de informática computacional, como é o caso do Projeto do Genoma Humano. Os métodos utilizados são apenas para uma primeira triagem e identificação de um conjunto de locais de CpG, e sendo depois necessária a validação dos marcadores selecionados [101].

Depois de selecionar os locais certos de CpG, o ensaio deve ser cuidadosamente desenhado de modo a que possa ser aplicado para a análise forense. Amostras forenses são muitas vezes de baixa quantidade e qualidade, por isso é importante que o método proposto possa ser aplicado em muito pouco DNA ou DNA degradado. Ambos os protocolos de conversão por bissulfito e ensaios usando enzimas específicas de restrição de metilação apresentam altos graus de sensibilidade. Em ambos os casos são necessários os controlos apropriados.

Outros passos muito importantes do projeto são a amplificação PCR e desenho do *primer*. Quando se utiliza o bissulfito de sódio, os *primers* devem ser desenhados para conter algumas citosinas não CpG, de modo a que apenas o DNA convertido por bissulfito seja amplificado. Além disso, as sequências de iniciadores não devem conter nenhum local

CpG, exceto nos casos em que é escolhido PCR por metilação específica. Diferenças na sequência de DNA metilado e entre os fragmentos amplificados não metilados pode traduzir-se numa amplificação preferencial por PCR e devem ser usados controles conhecidos de metilação do DNA para normalizar os dados.

Em todos os testes forenses, os critérios de validação devem ser rigorosos e têm de ser cumpridos para cada marcador epigenético selecionado. Todos os marcadores devem mostrar uma alta sensibilidade e especificidade, uma vez que as amostras forenses são frequentemente de baixa qualidade e quantidade [32].

Como mencionado anteriormente, a metilação do DNA, é um mecanismo epigenético responsável por uma série de atividades no interior da célula. Fatores ambientais, tais como o envelhecimento, *stress* ambiental, doenças, cancro, tabagismo e outros, podem interferir nos padrões de metilação do DNA, alterando-os [32]. Assim, na sequência de verificação do padrão de metilação do DNA específico de fluido corporal de um determinado local CpG, é necessário analisar um grande número de amostras e garantir que estes locais CpG não exibem grande variação nos seus níveis de metilação (baixa variação interindividual). Além disso, a influência dos fatores ambientais têm de ser validados em casos de aplicação forense. Por exemplo, a fim de propor um determinado local CpG que demonstra ser específico para um fluido corporal, o padrão de metilação do DNA deve ser confirmado que também não é dependente da idade ou influenciado por fatores ambientais [101]. Nos casos em que os níveis de metilação do DNA podem ser quantificados, é essencial escolher locais CpG que mostram claramente um elevado grau de diferença de metilação, para obter uma maior margem e discriminação. Por exemplo, a fim de correlacionar um local CpG específico com uma determinada causa de morte, como o abuso de drogas, a metilação desse local CpG precisa de demonstrar no mínimo uma diferença entre 60-70 % em comparação com o tecido normal. Isso também evita falsas estimativas devido à elevada variação intraindividual [32].

6.1. Identificação de fluidos/tecidos

A identificação da fonte biológica do fluido/tecido encontrado nos locais de crime pode ser muito importante uma vez que fornece informação crucial para relacionar as provas com o crime. O DNA obtido a partir de fluidos corporais, tais como sangue, saliva e sémen, pode ser usado para identificar o dador do material biológico, e determinar o tipo e origem do material biológico, o que ajuda a reconstruir cenas de crimes [102].

Os testes de identificação de fluidos/tecidos são baseados em testes imunológicos ou enzimáticos (ambos tem uma base proteica) e dependem da estabilidade da molécula alvo para a deteção da atividade ou presença da proteína que é específica para um determinado tecido. Os testes proteicos têm algumas vantagens em relação a muitos métodos clássicos e por isso os têm substituído, embora algumas técnicas como a identificação microscópica de espermatozoides, que é considerada a forma mais segura de deteção de esperma e um dos métodos clássicos, permaneça em uso [103].

Um exemplo de teste proteico de orientação é a reação da Brentamina, que determina a atividade da fosfatase ácida. Se a reação for positiva indica a presença de células seminais, mesmo na ausência de espermatozoides, e traduz-se, após aplicação do reagente, no aparecimento de uma coloração púrpura numa mancha que se suspeita ser de sémen. No entanto, por vezes, o resultado é duvidoso, por se tratar de uma reação colorimétrica e, nalguns casos, de difícil interpretação devido à cor do próprio tecido onde a reação é efetuada.

Os testes proteicos têm limitações específicas, como por exemplo, o facto de as proteínas serem menos estáveis que o DNA. O teste depende da presença da proteína intacta e/ou funcional pelo que pode não funcionar em amostras degradadas [104]. A baixa especificidade é outra limitação associada a muitos testes proteicos, devido à possível reação cruzada com outras espécies moleculares ou tecidos [105].

A maioria dos testes proteicos produz um resultado não quantitativo, indicando apenas a presença ou ausência do material testado, por isso são subjetivos, fornecendo resultados ambíguos e impossibilidade de quantificar a contribuição de múltiplas fontes de tecido. Outra consequência de testes não quantitativos é o facto de não existir grau de

confiança estatística em resultados positivos ou negativos. A maior limitação dos testes proteicos é consumirem grande quantidade de amostra, reduzindo a quantidade de DNA presente, facto que é determinante na análise de amostras reduzidas. Além disso, a maioria dos testes, incluindo os *kits* comerciais, aplica diferentes tipos de formatos não standardizados, dificultando os procedimentos automáticos e repetidos. Por fim, os sistemas proteicos também requerem trabalho manual aumentando o risco de erro humano.

A identificação convencional de tecidos/fluidos corporais usando testes proteicos pode não confirmar a sua presença. Mesmo quando um teste de coloração forense é positivo para um fluido em particular, a disponibilidade do perfil de DNA pode vir de um fluido ou tecido diferente [13]. Assim, um método de confirmação que permite a identificação da fonte celular de perfis de DNA seria um instrumento valioso na reconstrução cenas de crime.

Avanços recentes na genética forense revelaram que o RNA extraído das mesmas fontes biológicas do DNA pode ser usado para identificar fluidos através da quantificação do RNA, que é específica para certos fluidos [104].

Foi reportado um método alternativo que analisa espécies de mRNA em tecidos específicos [104-106] e recentemente em miRNA (MicroRNA, representa uma molécula pequena de RNA não codificante) [107]. Devido à diferente expressão do gene em diferentes tecidos, os níveis de mRNA e miRNA podem indicar a origem do tecido e estas moléculas representam melhor a sua origem, o que pode ultrapassar algumas limitações associadas aos testes proteicos. No entanto estes testes apresentam como desvantagem o facto do RNA ser menos estável que o DNA devido à presença de RNases ubíquas [105] e necessitar de consumir amostra, a não ser que o RNA seja co-extraído como o DNA.

Como foi referido anteriormente, o DNA tende a ser mais estável que as proteínas nas amostras. Devido à necessidade da presença intacta e/ou funcional da proteína, é comum que os testes proteicos falhem na identificação correta do tecido. Os métodos de análise de metilação do DNA tendem a funcionar melhor em amostras onde o perfil de DNA é bem sucedido. Como o DNA é mais fácil de manipular e é usado para identificação individual, a identificação do método ideal para fluidos corporais usando o DNA seria benéfico para os casos forenses pois é vulgar encontrar vestígios de fluidos corporais em locais de crime [13].

Estão descritos dois promissores métodos de identificação de tecidos, a fluorescência [108] e espectrofotometria Raman [109], que permitem identificar tecidos em amostras. Contudo, a especificidade do tecido pode ser problemática devido a reação cruzada com material biológico de outras espécies [110] e outros materiais não biológicos que podem estar presentes na amostra. O teste de identificação de tecidos ideal é aquele que não consuma amostra e esteja mais relacionado com a quantidade de DNA. Os testes forenses de identificação de tecidos baseados na metilação do DNA podem ultrapassar as limitações associadas aos métodos existentes. Foi demonstrado que diferentes formas de metilação afetam diferentes tecidos [52].

A técnica baseada na metilação do DNA permite identificar a origem do tecido e provavelmente de uma forma independente do utilizado e do cálculo da probabilidade do seu resultado ser correto/incorrecto. Isto é, algo similar ao perfil de DNA que pode indicar a associação entre duas amostras (por exemplo, comparação entre o perfil do DNA de uma amostra de cena de crime e o perfil de uma amostra de um suspeito) e demonstra uma associação significativa através de probabilidades de correspondência [11].

A técnica baseada na metilação do DNA foi desenhada para ser combinada com o perfil de DNA. A técnica combinada pode ter mais vantagens que a isolada; requer menos manipulação da amostra e pode ser automática, reduzindo o trabalho, risco de contaminação e erro humano – todas estas são qualidades de uma boa técnica [102].

Um exemplo de confirmação da técnica de metilação do DNA é a detecção de sémen através do uso do microscópio. Além disso, o facto da técnica de identificação de tecidos poder indicar não apenas a presença ou ausência de um tecido/fluido específico mas também analisar quantitativamente o tecido na amostra, é importante na mistura de amostras pela ligação entre perfis específicos e a correspondência da origem do tecido [11].

Os métodos proteicos atuais só analisam um tecido de cada vez enquanto a técnica baseada na metilação pode analisar múltiplos tecidos num único teste, sem requerer um conhecimento específico ou ter uma suposição em relação à natureza da amostra. Assim, se este método for aplicado a uma amostra pobre em DNA, pode resolver ou explicar melhor alguns resultados [11]. A técnica baseada na metilação de DNA pode ter especificidade superior aos testes proteicos.

O sémen (suspensão de espermatozoides no líquido seminal), é a seguir ao sangue o vestígio mais estudado, o que se deve ao facto de haver muitos casos de suspeita de agressão sexual registados. O DNA a analisar é extraído dos espermatozoides. Por isso, é conveniente efetuar, em primeiro lugar, uma confirmação microscópica da sua existência na amostra a estudar. Depois da extração do DNA do vestígio biológico ou dos exsudados vaginais ou anais, procede-se ao estudo da amelogenina. O gene amelogenina pode ser usado na determinação do sexo de amostras de origem humana desconhecido através de PCR, por exemplo. A amplificação do gene homólogo da amelogenina permite concluir que quando estão presentes células masculinas aparecendo duas bandas (ou picos, dependendo do método de deteção), uma com 212 pb, específica do cromossoma X e outra com 218 pb, característica do cromossoma Y (os tamanhos em pares de bases podem variar dependendo dos *primers* usados).

No campo forense, Frumkin *et al.* [11] foram os primeiros a explorar a possibilidade de identificação de tecidos baseado na metilação do DNA. A deteção de sémen foi indicada apenas nas amostras de sémen e não em amostras de urina, que se sabe que pode reagir de forma cruzada noutros métodos para deteção de sémen. Vários tecidos biológicos (sangue, saliva, sémen, pele, urina, sangue menstrual e secreção vaginal) foram analisados utilizando *loci* genómicos e mostraram níveis de metilação diferencial e foi observada uma variação dos níveis de metilação entre os diferentes indivíduos.

Lee *et al.* [13] selecionaram tDMRs que esperavam mostrar diferente perfil de metilação do DNA em vários fluidos corporais, e procederam à determinação do perfil da metilação do DNA desses tDMRs usando várias amostras de sangue, saliva, sémen, fluido vaginal e sangue menstrual. Os cinco candidatos tDMRs utilizados mostraram metilação diferente nos vários fluidos corporais. As diferenças mais evidentes nos tDMRs foram do gene DACT1 e USP49 do sémen. Além disso, os resultados sugerem o valor potencial do tDMR PFN3 para a identificação do fluido vaginal, enquanto o marcador PRMT2 pode ser útil para diferenciar sémen de outros fluidos baseado na hipometilação. Os resultados foram muito promissores para a aplicação de marcadores de metilação do DNA na identificação de fluido corporal no entanto, foram observadas diferenças entre sexos em todas as amostras, excluindo o sémen e a variação entre os indivíduos foi novamente observada. Os autores concluíram que todos os métodos acima mostram o potencial de usar marcadores para a identificação epigenética de um fluido corporal no entanto, nenhum dos

métodos permite obter resultados quantitativos precisos, uma vez que a maioria das abordagens é qualitativa.

Recentemente Choi *et al.* [111] apresentou no congresso de *International Society for Forensic Genetics (Melbourne, Setembro de 2013)*, um estudo de identificação de fluidos corporais (sêmen, saliva e fluido vaginal) através da análise simultânea de metilação do DNA e bactérias específicas desses fluidos. Utilizou um método de enzimas de restrição sensíveis à metilação seguido da PCR *multiplex* e verificou que este método permite a identificação simultânea de quatro tDMRs, USP49, DACT1, L81528 e PFN3, e quatro marcadores específicos para *L.crispatus*, *L.gasseri*, *S.salivarius* e *V.atypica*. Este método de comparação direta pode ser usado para distinguir o sangue, a saliva, o sêmen e o fluido vaginal.

Concluindo, a técnica de identificação de fluidos/tecidos baseada na metilação do DNA é bastante promissora em aplicações forenses por ser altamente específica por permitir identificar vários tecidos diferentes de um modo automático. Finalmente, por poder ser combinada com a análise de STRs (polimorfismos analisados na determinação dos perfis de identificação), o que permite reduzir o consumo da amostra, trabalho e custos da análise. A identificação de tecidos por metilação constitui, assim, uma ferramenta com um enorme potencial de utilidade na análise forense de materiais biológicos.

Autenticação do DNA

O DNA revolucionou a ciência forense, e tornou-se uma ferramenta dominante na aplicação da lei. Hoje, a evidência do DNA é a chave para a condenação ou exoneração de suspeitos de vários tipos de crime, como roubo, violação e assassinato.

Quantidades exíguas de material genético (amostras LCN - *Low Copy Number*), em que estão presentes apenas algumas células, têm alterado a forma de encarar a cena do crime. Alguns vestígios que até agora não eram considerados como suscetíveis de proporcionarem resultados, podem atualmente ser analisados com sucesso. As impressões digitais são um bom exemplo.

No entanto, a possibilidade perturbadora de que a evidência de DNA pode ser falsificada, foi esquecida. Determinadas técnicas de biologia molecular, como PCR, clonagem molecular, e amplificação do todo o genoma (WGA), permitem que de uma

forma acessível se possa produzir quantidades praticamente ilimitadas de DNA sintetizado *in vitro* (artificial) com qualquer perfil genético desejado. Este DNA artificial pode então ser aplicado às superfícies dos objetos ou incorporado em tecidos humanos genuínos e plantado em cenas de crime. Adotar um ensaio de autenticação para tratamento de casos de amostras, como parte do procedimento forense é necessário para manter a alta credibilidade de provas de DNA no sistema judiciário.

Frumkin *et al.* [10] mostram que o atual procedimento forense não consegue distinguir entre amostras de sangue, saliva e pele de DNA artificial, e as correspondentes amostras de DNA *in vivo*. Além disso, a genotipagem de amostras produziram perfis completos sem anomalias independentemente da origem (*in vivo* ou *in vitro*). A fim de lidar eficazmente com este problema, esta equipa de investigação desenvolveu um ensaio de autenticação, que distingue entre o DNA natural e artificial com base na análise de metilação de um conjunto de *loci* genómicos: em DNA natural, alguns *loci* são metilados e outros são não metilados, enquanto que no DNA artificial todos os *loci* são não metilados. O DNA *in vivo* contém ambos os *loci*, não metilados e metilados. A propósito deste estudo foram escolhidos dois *loci* que são consistentemente metilados e dois, que são não metilados. O ensaio foi testado em amostras naturais e artificiais de sangue, saliva, e pele, com sucesso. Estes investigadores mostraram que as formas de metilação podem ser usadas para diferenciar entre o DNA natural ou artificialmente sintetizado.

Degradação do DNA em amostras biológicas

Fatores ambientais podem danificar o DNA e isso pode interferir na identificação de tecidos baseada no DNA. A degradação do DNA pode fragmentar a molécula, sendo os principais fatores que a provocam, a temperatura, a humidade e a luz (solar e raios ultravioleta). A degradação tem como consequência a dificuldade ou até a não obtenção de resultados e nunca o aparecimento de um genótipo distinto daquele que corresponderia à amostra.

O DNA é muito estável podendo-se manter estável durante muitos anos e, por isso, em condições de ser estudado e de proporcionar bons resultados, especialmente usando a técnica de PCR. Algumas vezes a degradação em vez de impedir a obtenção de resultados pode ocasionar a visualização de um único alelo em vez de dois, sendo mais frequente que desapareça o alelo de maior dimensões. Por isso, quando se analisam vestígios com uma

certa antiguidade e se obtém homozigotia para alguns sistemas deve-se ter cuidado na utilização desses resultados, pois podem ser heterozigóticos.

Para evitar a degradação de amostras deve-se promover a secagem completa do vestígio antes do seu acondicionamento (colocar em embalagens próprias - envelopes, pequenos sacos de papel de celofane, etc.) e armazenagem, que deve ser efetuada a baixas temperaturas.

A degradação do DNA numa amostra pode levar à falsa identificação do tecido porque o *locus* metilado que não é amplificado devido à degradação, pode ser avaliado como não metilado. Assim, a identificação de tecido pode usar pequenas cadeias filhas produzidas a partir de PCR (produtos de amplificação) que são as menos afetadas pela degradação do DNA [11]. Frumkin *et al.* [11] usaram produtos de amplificação mais pequenos que a maioria dos utilizados no perfil STR, e assim a suas técnicas de identificação de tecidos foram bem sucedidas em amostras degradadas.

6.2.Paternidade

Origem paterna e materna

A investigação biológica da paternidade tem como objetivo, dado um trio (filho, mãe e pretenso pai), determinar se o pretenso pai é ou não excluído da possibilidade de ser o pai biológico [112].

Os marcadores genéticos são segmentos de DNA cuja sequência e localização no genoma são conhecidas. Antes de 1985, tanto as investigações biológicas de paternidade como a análise de amostras biológicas com interesse criminal eram resolvidas mediante o estudo de marcadores biológicos com destaque para as proteínas. Hoje, a utilidade destes marcadores tem um interesse limitado, por serem sistemas pouco polimórficos.

A Medicina Legal dispõe, atualmente, de uma tecnologia que se baseia na variabilidade da sequência de DNA. A principal vantagem desta tecnologia reside no facto de se estudar a individualidade biológica diretamente do código genético, ao contrário das proteínas, cuja caracterização depende da sua expressão em tecidos e fluidos biológicos. É de salientar que o DNA está presente em todas as células nucleadas do organismo humano

(DNA nuclear) e que esse DNA é, basicamente, idêntico em todas as células do mesmo indivíduo.

O estudo do DNA recorrendo à PCR constitui hoje uma tecnologia que é admitida internacionalmente como prova pericial em tribunal, permitindo a resolução de casos de filiação complexos, como, por exemplo, casos de investigação de paternidade em que a mãe ou o pretenso pai faleceram, quando existe a possibilidade do estudo de familiares próximos; o estudo de restos cadavéricos e a comparação das suas características genéticas com as de amostras de familiares próximos; e ainda casos de filiação em que se dispõe de restos fetais resultantes de aborto ou infanticídio, em que se pretende identificar o autor do crime. Tem sido especialmente na resolução de casos relativos à criminalística biológica que esta tecnologia tem demonstrado uma importância fundamental, uma vez que na maioria dos casos relacionados com crimes o perito dispõe de uma quantidade exígua de DNA, apresentando-se muitas vezes degradado.

No teste de paternidade, especialmente nos casos em que não se dispõe da informação genética da mãe, o perfil paterno frequentemente não se consegue determinar. A probabilidade de exclusão da paternidade de um marcador genético é consideravelmente reduzido. No teste de paternidade, o alegado pai é excluído se não tiver o gene obrigatório, o qual pode ser determinado a partir do genótipo da criança, quando a mãe é conhecida [7]. Mas em alguns casos, a mãe e o filho tem genótipo heterozigótico idêntico ou em casos sem mãe, o gene obrigatório não pode ser determinado. Como resultado, a probabilidade de exclusão é consideravelmente reduzida. Para compensar a redução de eficiência, tem de se usar mais marcadores genéticos, recorrendo ao estudo de metilação de genes *imprinted*. Assim, torna-se interessante e revolucionário haver uma nova técnica, que usa o estudo de metilação de genes *imprinted*, em que os alelos parentais possam ser determinados sem análise genealógica [7].

Como já foi referido, todos herdamos duas cópias (alelos) de cada gene autossómico, um da mãe e um do pai. Na maioria dos casos, ambos os alelos são ativos, no entanto, para um pequeno grupo de genes, ocorre *imprinting* e inativação do cromossoma X. Nestes casos, o alelo materno e paterno são metilados de forma diferente e teoricamente, a origem parental do alelo pode ser determinada pela análise do padrão de metilação [32].

Por exemplo, num *locus imprinted* materno, se um alelo estiver metilado, foi herdado da mãe, se não estiver metilado foi herdado do pai. O padrão de metilação de um alelo pode ser analisado por PCR pós digestão ou PCR específico de metilação.

Pesquisadores da Universidade de Ciência e Tecnologia da China [7] testaram a utilização de marcadores de metilação para determinar a origem específica dos alelos (maternos ou paternos) estudados com a utilização de marcadores polimórficos do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Simples - consistem na substituição de um único nucleótido num determinado *locus*) utilizando PCR pós-digestão ou PCR metilação-específico. Com este estudo verificaram que os SNPs podem ser usados para determinar a origem dos alelos autossômicos.

Por sua vez, Poon *et al.* [113] procuraram determinar a paternidade do feto a partir de padrões de metilação diferenciada em determinadas regiões. A determinação da relação de parentesco (paternidade) foi realizada a partir da identificação do DNA fetal no sangue materno (no plasma) utilizando os padrões de metilação. Esta abordagem significa a possibilidade de realização de testes de paternidade pré-natal sendo ainda menos invasivos se comparado com testes atuais.

No trabalho de Zhao *et al.* [7] foi explorada a possibilidade da utilização de marcadores de metilação do DNA para determinar a origem parental dos alelos. Para isso foi escolhida o SNP rs22008 como sistema modelo. O rs220028 encontra-se dentro de uma região de metilação diferenciada do gene responsável pela codificação da proteína N. O referido trabalho reporta a possibilidade de determinar a origem parental dos alelos em todos os tecidos testados (rim, pulmão, coração, fígado, músculo, cérebro, pele e sangue).

Nakayashiki *et al.* [8, 9] realizaram a análise de um conjunto de SNPs em cinco genes *imprinted* utilizando o método de sequenciação por bissulfito numa gama de tecidos (sangue, sêmen, saliva, unhas e cabelo). O alelo materno poderia ser detetado a partir do gene expresso maternalmente (H19), e os alelos paternos a partir de genes expressos paternalmente (HYMA1, SNRPN, PEG3). No entanto, foi detetado um inesperado nível de metilação em alguns tecidos, tais como unhas, cabelo e do esperma, bem como em amostras expostas a temperaturas elevadas ou períodos mais longos de preservação.

Em conclusão, a discriminação parental de alelos polimórficos de genes *imprinted* pode ser muito promissora para análise de herança autossômica, que se torna difícil em casos de paternidade, no entanto são necessários mais estudos sobre a especificidade e

estabilidade de metilação do DNA. Isto é especialmente verdadeiro para o uso de padrões de metilação para fins forenses.

6.3.Discriminação de gémeos monozigóticos

Sempre foi um desafio na área forense a identificação individual de gémeos monozigóticos. A tipagem de DNA convencional não pode ser realizada com gémeos monozigóticos pois estes partilham a mesma sequência de DNA. No entanto, os gémeos costumam mostrar várias diferenças fenotípicas. Estas diferenças resultam de modificações epigenéticas [16, 32].

No congresso de *International Society for Forensic Genetics* em 2013[114] Shujin Li (China) apresentou um estudo em que provou que o gene LINE-1 é um potencial indicador de identificação de gémeos monozigóticos. Utilizou amostras de sangue e saliva de gémeos monozigóticos e dizigóticos e escolheu uma ilha CpG no LINE-1, porque verificou que em gémeos monozigóticos este gene apresentava um nível de metilação elevado. Todo o genoma foi extraído destas amostras e efetuaram uma genotipagem com 19 STRs para identificar gémeos monozigóticos e dizigóticos. Os níveis de metilação foram diferentes em cada um dos pares, tanto nos gémeos monozigóticos como dizigóticos. As amostras de sangue apresentaram um nível de metilação superior, no gene LINE-1 em gémeos monozigóticos, às de saliva nos locais CpG estudados. Assim, com este estudo concluiu que apenas pela medição de metilação do gene LINE-1 é viável distinguir gémeos monozigóticos e gémeos dizigóticos. No entanto, verificou-se a necessidade de mais estudos de locais CpG específicos e na relação da metilação do LINE-1 para determinar a influência da idade.

Li *et al.* [15] testaram amostras de sangue de 22 pares de gémeos monozigóticos adultos para verificarem diferenças de metilação, revelando diferenças significativas de metilação (377 *locus* CpG), no entanto é necessário uma investigação mais aprofundada sobre as alterações do estado de metilação CpG consoante a idade, tecido ou população.

6.4.Determinação da causa e circunstâncias de morte

As funções essenciais do patologista forense incluem a investigação da causa e circunstâncias da morte, especialmente em mortes inesperadas ou súbitas, sem testemunhas. Vários estudos visam a utilização de perfis mRNA em tecidos provenientes de cadáveres para encontrar pistas sobre os eventos que aconteceram no momento da morte [105, 115]. A composição de diferentes transcritos de RNA dentro das células de um tecido não é estável, podendo variar de acordo com as necessidades específicas das células em resposta às condições ambientais. Assim, cada tipo de morte ativa diferentes mecanismos moleculares que podem ser detetados através de diferentes padrões de expressão gênica. No entanto, a instabilidade do mRNA pode ser um problema quando se trabalha com tecidos humanos *postmortem*. Como mencionado anteriormente, a metilação do DNA é um mecanismo epigenético que altera a expressão do gene. Estudos recentes têm demonstrado que várias doenças cancerígenas estão associadas com alterações anormais nos níveis de metilação de DNA e, por isso, seria interessante determinar se o estado da metilação do DNA das regiões promotoras de certos genes pode mudar em resposta à diátese e/ou as causas da morte [32].

Kovatsi *et al.* [20] investigaram o estado de metilação da região promotora do gene P16 no sangue de indivíduos que tinham sido expostos ao chumbo. Um dos principais sintomas do envenenamento por chumbo é o desenvolvimento de perturbações neurológicas, estreitamente relacionadas com mudanças de metilação do DNA. Neste estudo, os níveis de metilação foram determinados através de PCR específico para metilação (MSP) seguido de desnaturação térmica. Verificou-se que a metilação do P16 foi de facto frequente nos indivíduos expostos ao chumbo. Indivíduos altamente expostos (sangue Pb^{2+} concentração: 51-100 mg/dl) demonstraram metilação completa, enquanto nos expostos a baixa concentração (6-11 mg/dl) observou-se metilação parcial [20].

Além disso, foi examinado o estado de metilação do gene do relógio circadiano usando amostras de autópsia forense [21]. Os genes do ciclo circadiano têm um papel importante no arranjo do relógio biológico; a metilação anormal destes genes contribui para o aumento da morbidade. Assim, o distúrbio do ritmo circadiano pode ter um papel importante no desenvolvimento de doenças. Nos casos de morte súbita não é possível identificar anomalias patomorfológicas devido à arritmia cardíaca ou influência de

medicação a longo prazo, o que é encontrado frequentemente no campo da medicina forense [116, 117]. Em alguns pacientes a causa por morte súbita, a homeostasia pode ser alterada devido a fatores ambientais, condições de vida e/ou tratamento por fármacos. Embora estas pessoas não mostrem anomalias patomorfológicas, a sua suscetibilidade a doenças causadas por *stress* pode ser intensificada.

Nakatome *et al.* [21] pensam que o ritmo circadiano aberrante é uma anomalia difícil de detetar, por isso, estudaram 9 genes do relógio circadiano. E pretendiam verificar se o estudo da metilação do DNA nas regiões promotoras de genes do relógio circadiano estão relacionadas com causas de morte, tentando detetar modificações de metilação do DNA em espécimes forenses de autópsia. Como já foi referido, o padrão de metilação varia entre indivíduos e entre tecidos do mesmo indivíduo; neste estudo também concluíram que o padrão de metilação dos genes promotores do relógio circadiano varia entre indivíduos, no entanto este estudo não demonstrou uma ligação entre o padrão de metilação e a causa da morte. Assim, ainda é muito cedo para desenhar e conclusões definitivas.

Pensa-se que os genes com regiões promotoras não dependem da metilação do DNA para o controlo da sua expressão porque as regiões promotoras não são metiladas independentemente do nível de expressão. A metilação *de novo* de uma região de um promotor é um fenómeno raro durante o envelhecimento de tecidos somáticos normais.

Atualmente, sabe-se que a relação entre a desregulação circadiana e a dependência de drogas, como a cocaína, morfina e metanfetamina (MAP) está relacionada com a metilação [22, 118, 119]. Além disso, o consumo excessivo de álcool inibe a expressão de genes do relógio circadiano.

Numachi *et al.* [22] sugeriram que a MAP pode resultar na metilação diferencial do DNA e a expressão do gene no cérebro de rato. Aqueles investigadores encontraram uma diferença na mRNA da DNMT1 (DNA metiltransferase 1) com um tratamento crónico de MAP. A DNMT1 está envolvida na preservação do padrão de metilação do DNA que modula as funções de ativar ou desativar a expressão génica.

Por seu turno, Masubuchi *et al.* [23] reportaram que o tratamento crónico com MAP causa dessincronização interna na locomoção no ciclo luz-escuro do sistema circadiano do rato. Embora a influência de MAP na forma de metilação das regiões promotoras não se tenha estudado antes, estes factos indicam a possibilidade de MAP indiretamente regular o

Sistema Nervoso Central devido à sua ação sobre os neurotransmissores, hormonas e sistemas recetores.

Na regulação da expressão dos genes circadianos, sabe-se que *Per1* e *Cry1* medeiam a primeira resposta à luz da manhã e depois iniciam o ciclo circadiano [120, 121]. A forma de metilação das regiões promotoras dos genes circadianos varia entre indivíduos e entre tecidos do mesmo indivíduo. Embora não se compreenda a relação entre os padrões de metilação e a causa de morte, sabe-se que características biológicas representam diferenças nas regiões promotoras de genes do relógio circadiano entre indivíduos.

6.5. Estimativa de idade

A estimativa da idade de uma pessoa é uma questão importante em investigações forenses e várias metodologias têm sido relatadas, a fim de resolver este problema. Está bem estabelecido que quando um esqueleto é recuperado, uma estimativa da idade aquando a morte (idade biológica) pode ser feita por análise de várias mudanças morfológicas relacionadas com o esqueleto ou os dentes [122].

O processo natural de envelhecimento provoca uma série de alterações de tecidos e órgãos, que se acumulam ao longo de um tempo de vida e podem ser examinadas ao nível molecular.

Frumkin *et al.* [11] apresentaram diferenças de metilação relacionadas com a idade, em marcadores como o *DACT1*, *USP49*, *PRMT2* e *PFN3*. Utilizando amostras de sangue, saliva e sêmen para três tDMRs, mostrou hipometilação específica tanto no sêmen homens jovens como de idosos.

Meissner *et al.* [17] identificaram mecanismos relacionados com o envelhecimento que prometem ser úteis no futuro próximo. Estes incluem o acúmulo de danos do DNA que se reflete na quantidade de deleções do DNA mitocondrial, o encurtamento dos telómeros ao longo de cada divisão celular, bem como alterações de proteínas essenciais ao processo de envelhecimento. Apesar dos esforços dos investigadores, todos os métodos propostos apresentam limitações e, na maioria dos casos apresentam baixa precisão [17].

A análise epigenética poderia servir como um método para determinar/estimar a idade, pois como é conhecido, a metilação do DNA é um dos os mecanismos responsáveis pela diferenciação celular e os efeitos de envelhecimento. Um modelo ideal para estudar as

diferenças de metilação do DNA entre idades são os gémeos monozigóticos. Existem vários estudos que examinam o estado epigenético de gémeos monozigóticos, mas todos eles sofrem de uma estimativa de idade limitada [16].

Bocklandt *et al.* [18] realizaram uma análise na metilação do genoma utilizando amostras de saliva de 34 pares de gémeos idênticos (21-55 anos). Foi identificado um subconjunto de 88 novos *loci* altamente correlacionados com idade. Com base em três locais de CpG, um modelo de regressão foi criado, conseguindo-se prever a idade de um indivíduo com intervalo de precisão de 5,2 anos.

Além disso, Koch e Wagner [19] analisaram vários conjuntos de dados de 13 tipos diferentes de células ou tecidos. Inicialmente, identificaram 431 genes associados à idade hipermetilados e 25 genes associados à idade hipometilados nos locais CpG. Em seguida, selecionaram um subconjunto de cinco sítios CpG (TRIM58, KCNQ1DN, NPTX2, BIRC4BP e GRIA2). Notavelmente, um desses locais de CpG (NPTX2) foi incluído no estudo anterior de Bocklandt *et al.* [18]. A estimativa precisa da idade por métodos moleculares não é uma tarefa fácil, já que o envelhecimento é biologicamente muito complexo. No entanto, investigações futuras associadas a padrões epigenéticos podem influenciar a nossa compreensão do envelhecimento, não só na área da saúde, mas também na doença, para além da importância da determinação de idade de cadáveres.

6.6.Neuropsiquiatria

Uma vez que as doenças mentais alteram a conduta das pessoas, muitas vezes estas patologias trazem problemas legais para aqueles que são acometidos. Estas situações são muito frequentes e diversificadas por isso tornou-se necessário o estabelecimento de uma subespecialidade dentro da Psiquiatria - a Psiquiatria Legal ou Forense.

A metilação do DNA é um dos processos epigenéticos mais bem caracterizado e estável [44], tornando-se o foco da maioria de estudos epigenéticos psiquiátricos [25].

Tem sido especulado que as alterações epigenéticas podem ter um papel na etiologia de doenças psicóticas como a esquizofrenia e a bipolaridade [24]. Novas abordagens com vista a uma melhor compreensão da contribuição de fatores ambientais e alimentares sugerem que alguns deles podem estar envolvidos no desenvolvimento da neurodegeneração, causando modificações epigenéticas [123].

Mudanças epigenéticas no cérebro têm sido associadas a vários processos neurobiológicos como o crescimento e desenvolvimento cerebral [84], aprendizagem e memória, uso de drogas [124], neurodegeneração [123] e relógio circadiano [125]. Tem sido especulado que a disfunção epigenética no cérebro pode ser a causa de um espectro de doenças psiquiátricas como a psicose [26, 126, 127].

A metilação da H3 na lisina 4,9,27 (H3K4, H3K9 e H3K27) foi identificada como um marcador epigenético estável que parece estar bem preservado nos tecidos *postmortem* [83], sendo estas modificações úteis para estudos de psicose no cérebro. O perfil de metilação de histonas em regiões promotoras pode fornecer pistas importantes sobre os mecanismos da expressão do gene no cérebro humano durante o desenvolvimento e na doença. Curiosamente, mutações nos genes que codificam componentes específicos de H3K9 e H3K4, têm sido associadas a atraso mental e autismo, respetivamente [83]. A metilação H3K4 é geralmente associada à ativação do gene, enquanto a metilação H3K9 e 27 está associada à diminuição de expressão génica [83]. Tal como a metilação do DNA, a modificação de histonas é muito dinâmica e regulada por enzimas catalíticas, como as acetiltransferases e desacetilases de histonas (HDACs), que adicionam e removem grupos acetil respetivamente [128]. A DNMT1 é uma enzima que intervém no estabelecimento de padrões de metilação, tendo sido descrita como sub-expressa no córtex pré-frontal de doentes bipolares e esquizofrénicos [25, 129]. Juntos, esses resultados reforçam a importância da metilação da lisina de histonas para o desenvolvimento do cérebro ordenado e também como um conjunto de ferramentas moleculares para estudar a função da cromatina em tecido *postmortem*.

Veldic *et al* [25] realizaram um estudo com cérebros *postmortem* de pessoas com esquizofrenia e bipolaridade e constataram que a DNMT1 nestes doentes está aumentada e diminui na presença de medicação antipsicótica. Também a DNMT3A é frequente nestes doentes [129]. Estudos mostraram que enzimas que catalisam modificações pós-tradução de histonas também estão desreguladas na psicose. Os níveis de expressão de HDAC1, por exemplo, estão aumentados significativamente nestes pacientes. Observa-se também uma expressão diminuída de genes de HDAC4, -6 e -8 em pacientes bipolares [130]. Juntos, estes dados evidenciam um papel importante aos processos epigenéticos em pacientes com psicose.

Tsankova *et al.* [26] demonstra que os mecanismos epigenéticos da regulação genética em neurónios estão implicados na regulação do comportamento complexo, incluindo vários transtornos psiquiátricos tais como a depressão dependência de drogas, e a esquizofrenia. Por exemplo, a remodelação da cromatina no promotor *Bdnf* está associada com a atividade neuronal, convulsões, *stress* crónico, vício em cocaína, e síndrome de Rett. A Síndrome de Rett é uma anomalia no gene MECP2, que causa desordens de ordem neurológica, acometendo quase que exclusivamente crianças do sexo feminino.

O ácido gama-aminobutírico (GABA - *Gamma-AminoButyric Acid*) é o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central dos mamíferos. Ele desempenha um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso, e está relacionado com a fisiopatologia da esquizofrenia. Foi relatada modificação de histonas em promotores de genes GABA em cérebros de pacientes com esquizofrenia [127]. Existem evidências que indicam que as deficiências em relina, matriz extracelular de glicoproteínas que ajuda a regular processos neuronais e está envolvida no desenvolvimento sináptico, são responsáveis também pela etiologia da esquizofrenia. O promotor da relina contém vários locais para a metilação do DNA, e inibidores de HDAC e DNMT aumentam a atividade de expressão da relina, indicando que mecanismos epigenéticos controlam a expressão desta proteína. Todas estas observações indicam que a disfunção do estado normal epigenético do genoma pode ter consequências significativas na função cognitiva normal [86].

Embora muitos estudos mostrem as mudanças da expressão génica associada à psicose em cérebros *postmortem*, encontrando inúmeras evidências de transcrição alterada em vários genes, os estudos epigenéticos de psicose devem ser realizados na infância.

O estudo epigenético de doenças complexas é ainda um campo novo, embora existam estudos empíricos que identificam a associação entre modificações epigenéticas e psicose. É importante estabelecer quando ocorre esta mudança epigenética associada à doença; esta pode surgir antes da doença e contribuir para o fenótipo da doença ou pode ser um efeito secundário da psicose ou até da medicação anti-psicótica [24]. Estas incertezas podem ser resolvidas combinando estudos epigenéticos longitudinais com pesquisa usando métodos tradicionais, como estudos de associação do genoma e de gémeos monozigóticos, para detetar efeitos genéticos e ambientais no genoma.

Estudos epigenéticos da psicose têm algumas limitações. A maior limitação é a necessidade de cérebro humano *postmortem*. Isto porque as mudanças epigenéticas podem ocorrer em tecidos ou células específicas e parecem estar no local onde a desordem se manifesta. A qualidade do tecido é outra limitação. Além disso, estudos epigenéticos do cérebro estão também limitados pelo conhecimento insuficiente sobre os padrões normais epigenéticos característicos de diferentes regiões do cérebro, e tipo de células [85]. Adicionalmente sabe-se pouco sobre a forma como fatores como a idade, sexo e o ambiente, influenciam os padrões epigenéticos, por isso as amostras devem ser combinadas com cuidado para evitar a confusão entre variáveis.

7. Discussão e Conclusão

Embora a estrutura primária do DNA possua toda a informação genética para determinar as características físicas, biológicas e comportamentais de um indivíduo, outra informação herdável, capaz de alterar as características fenotípicas é o conjunto de fatores epigenéticos que regulam o DNA. A epigenética é uma área da genética que estuda fatores externos e ligados intimamente ao DNA controlando a expressão gênica e o fenótipo celular, não resultando numa mudança na sequência do DNA e tendo um impacto significativo sobre o desenvolvimento do organismo

As modificações epigenéticas constituem uma variedade de mecanismos que determinam o fenótipo sem alterar o genótipo. Estas modificações constituem um perfil único em cada tipo celular e definem a identidade celular pelo padrão de expressão gênica. Este perfil epigenético, o epigenoma, é modificado durante a diferenciação celular e mantido durante a divisão celular, o que garante que a célula filha tenha o mesmo fenótipo da célula mãe. No entanto, este perfil epigenético é reversível, podendo ser alterado devido a condições ambientais.

Já se conhecem alguns tipos de marcas epigenéticas que controlam a expressão gênica como a metilação do DNA, modificações de histonas e outros. De entre estas modificações, a metilação de DNA desempenha um papel crucial no desenvolvimento celular, diferenciação celular e processo de envelhecimento.

O *imprinting* é uma marcação epigenética reversível que ocorre de forma diferenciada entre os alelos parentais. Os genes que sofrem *imprinting* evidenciam regiões metiladas e cada *locus imprinted* tem pelo menos uma região diferencialmente metilada, que contribui para a expressão do gene. Por isso o *imprinting* genômico é um processo que pode ocorrer devido à metilação do DNA em alelos parentais durante o desenvolvimento do novo indivíduo. Desta forma, estudos envolvendo padrões de metilação do DNA em *locus imprinted* apresentam um potencial promissor nos avanços em genética forense. Uma vez que a metilação de regiões específicas do DNA ocorre de forma diferenciada para alelos maternos e paternos é possível determinar a origem parental de um alelo com base no seu padrão de metilação.

A metilação fornece aos vários tecidos do organismo um perfil de metilação específico, e o conhecimento de tDMRs pode ser bastante útil na área forense para identificar tecidos e fluidos.

Diversas técnicas descritas para perfis de metilação de DNA continuam a ser aplicadas em vários contextos de análise molecular e, provavelmente, na área clínica para diagnóstico das doenças e tratamento de estratificação. Neste trabalho, conclui-se que o método mais vantajoso na área forense poderá ser a conversão por bissulfito, pois a integridade do DNA é mantida e a quantidade de material de DNA necessário é relativamente baixa e para além disso a partir deste método pode-se usar vários métodos de deteção. Provavelmente, na prática o método de deteção mais vantajoso será o *MethyLight* pois apresenta uma flexibilidade de escolha elevada da região do DNA, mas o MSP em tempo real usando SYBR Green I® é o mais económico. No entanto, na área forense o método de escolha depende de muitos parâmetros, incluindo o âmbito da análise que é desejada, e o tamanho da amostra, bem como os custos. Espera-se que o desenvolvimento tecnológico de abordagens de alto rendimento continue num ritmo acelerado que permita o custo de análise eficaz de uma grande amostra.

Os métodos baseados nos eventos de metilação do DNA podem, portanto, serem vistas como importantes ferramentas para os estudos de genética forense constituindo um complemento para testes de paternidade, identificação de tecidos, determinação de idade, identificação da causa de morte, discriminação de gémeos monozigóticos e relação com a neuropsiquiatria.

A identificação de fluidos e tecidos em locais de crime é muito importante para a resolução de casos forenses, no entanto os métodos clássicos apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, o consumo da amostra e consequentemente do DNA presente e não são quantitativos. O uso de um método baseado na metilação do DNA elimina essas desvantagens e consegue em simultâneo um perfil de DNA do sujeito, devido ao facto de a única disponibilidade do perfil genético do DNA do suspeito se encontrar apenas num fluido ou tecido. As formas de metilação como são estabelecidas através da diferenciação celular fornecem aos vários tecidos um perfil de metilação único e específico. Os padrões de metilação entre os vários tecidos exibem uma variação superior à metilação entre os mesmos tecidos de diferentes indivíduos, o que é concordante com os diferentes padrões de metilação dos tecidos.

Com a revisão feita conclui-se a técnica baseada na metilação do DNA tem especificidade superior aos testes proteicos pois elimina a detecção cruzada, evitando falsos positivos. Além disso, a técnica baseada na metilação do DNA foi desenhada para ser combinada com o perfil de DNA, o que traz uma vantagem adicional aos métodos existentes. Assim, a técnica de identificação de tecidos baseada na metilação do DNA fornece alta especificidade, podendo identificar vários tecidos e pode ser combinada com STR e técnicas para reduzir o consumo da amostra, trabalho e custos.

Adicionalmente, o estudo da metilação do DNA também tem um papel ativo na área de autenticação de amostras. Pois hoje é possível sintetizar DNA, e isso torna-se um problema nas cenas de crime pois o DNA artificial pode ser introduzido nas mesmas. Vários estudos revelaram que no DNA artificial todos os *loci* são não metilados enquanto no DNA natural alguns *loci* são metilados, o que faz com que o uso de uma técnica baseada na metilação do DNA detete DNA artificial e os possa excluir diretamente da cena de crime. Como fatores ambientais podem degradar o DNA da amostra deve-se usar cadeias pequenas de DNA, pois estas são menos suscetíveis à degradação.

O estudo de doenças psiquiátricas em cérebros *postmortem* fornecem à Medicina Legal um papel ativo na investigação e estes estudos evidenciam que os padrões epigenéticos podem estar alterados em caso de doenças neuropsiquiátricas. Posto isto, em situações de homicídio o estudo epigenético de marcadores específicos de psicose pode complementar outras evidências.

A identificação individual de gémeos monozigóticos desperta muito interesse na área forense no entanto ainda são necessários mais estudos para encontrar marcadores epigenéticos precisos e estáveis passíveis de fazer esta discriminação.

Nos casos de paternidade em que não é possível uma análise geneológica, isto é, o perfil genético da mãe não é conhecido ou a mãe e o filho são heterozigóticos, a metilação do DNA têm uma aplicação importante.

A discriminação parental de alelos polimórficos de genes *imprinted* pode ser muito promissora para análise de herança autossômica, que se torna difícil em casos de paternidade, no entanto são necessários mais estudos sobre a especificidade e estabilidade de metilação do DNA.

A estimativa de idade também tem particular interesse na área forense e a análise epigenética pode servir no futuro para determinar a idade pois a metilação do DNA é dos mecanismos responsável pelo envelhecimento.

A investigação da causa e circunstâncias de morte é outro fator que pode ser estudado com biomarcadores epigenéticos. Os genes do ciclo circadiano são um dos exemplos, pois apresentam alterações de metilação em casos de abuso de substâncias que levam à morte.

No entanto, nenhum dos estudos revistos refere que os padrões de metilação testados e estudados foram analisados sistematicamente a fim de verificar se eram estáveis a fatores ambientais, pois a metilação pode ser um processo reversível. Por isso, antes de a investigação passar para a rotina deve-se conhecer com bastante precisão que padrões de metilação são estáveis a fatores ambientais e que fatores ambientais influenciam determinados padrões de metilação.

Podem ainda ser realizados estudos de ancestralidade biogeográfica a fim de despistar eventuais marcas epigenéticas características de populações.

Com base na revisão efetuada constata-se que as técnicas de identificação humana baseadas nos eventos de metilação do DNA podem ser vistas como ferramentas valiosas e complementares nos estudos de genética forense, no entanto, outros estudos ainda devem ser desenvolvidos para que se tenha uma melhor caracterização do padrão de metilação humana. Entretanto, esta nova ferramenta para identificação humana a partir de marcadores de metilação mostra-se como uma técnica poderosa no diagnóstico molecular.

Com este trabalho, pode-se concluir que a epigenética é deveras importante em estudos de Biologia Molecular, nomeadamente na área forense, onde por vezes existem problemas e degradação do material ou reduzida amostra.

O campo da epigenética reuniu a atenção dos cientistas nas últimas décadas, sendo considerado ainda relativamente novo. Deve-se ter atenção à série de questões fundamentais relacionadas com os fenómenos epigenéticos, que ainda estão por ser respondidas, bem como a aplicação de modelos epigenéticos em investigação forense. Como o epigenoma é ajustável e dinâmico, sendo alterado por fatores ambientais, os cientistas forenses tem necessidade de se manter a par das novas descobertas.

O grande objetivo da epigenética forense exige não apenas a superação de desafios relativamente ao desenho e interpretação de perfis epigenéticos, mas também explorar

estratégias inovadoras que possam lidar com a natureza das amostras forenses. Assim, o estudo mais sistemático e abrangente de epigenética forense permitirá identificar mais marcadores epigenéticos, ligações mais conclusivas entre a diferenciação de células e envelhecimento sob efeitos epigenéticos e permitirá revelar uma variedade de aplicações forenses que podem ser úteis para complementar ou mesmo inovar metodologias já existentes.

8. Referências bibliográficas

1. Allis CD, J.T., Reinberg D, Caparros M, *Epigenetics* ed. T.J. Danny Reinberg 2007, New York: Cold Spring Harbor. 502.
2. Waddington, *Canalization of development and the inheritance of acquired characters*. Nature 1942. **150**: p. 563–65.
3. Liu, H.C., et al., *A pilot study for circadian gene disturbance in dementia patients*. Neuroscience Letters, 2008. **435**(3): p. 229-233.
4. Chong, S.Y. and E. Whitelaw, *Epigenetic germline inheritance*. Current Opinion in Genetics & Development, 2004. **14**(6): p. 692-696.
5. Cavalli, G. and R. Paro, *Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator*. Science, 1999. **286**(5441): p. 955-958.
6. Rakyant, V.K., et al., *Metastable epialleles in mammals*. Trends in Genetics, 2002. **18**(7): p. 348-351.
7. Zhao, G.S., et al., *Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics*. Forensic Science International, 2005. **154**(2-3): p. 122-127.
8. Nakayashiki, N., et al., *Investigation of the methylation status around parent-of-origin detectable SNPs in imprinted genes*. Forensic Science International-Genetics, 2009. **3**(4): p. 227-232.
9. Nakayashiki, N., et al., *Studies on differentially methylated parental allele in imprinted genes*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2008. **1**(1): p. 572-573.
10. Frumkin, D., et al., *Authentication of forensic DNA samples*. Forensic Science International-Genetics, 2010. **4**(2): p. 95-103.
11. Frumkin, D., et al., *DNA methylation-based forensic tissue identification*. Forensic Science International-Genetics, 2011. **5**(5): p. 517-524.
12. Byun, H.M., et al., *Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns*. Human Molecular Genetics, 2009. **18**(24): p. 4808-4817.
13. Lee, H.Y., et al., *Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification*. International Journal of Legal Medicine, 2012. **126**(1): p. 55-62.
14. Fraga, M.F., et al., *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(30): p. 10604-10609.
15. Li, C., et al., *Identical but not the same: The value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e337-e338.
16. Sahin, K., et al., *DNA methylation analyses of monozygotic twins*. Current Opinion in Biotechnology, 2011. **22**: p. S105-S105.
17. Meissner, C. and S. Ritz-Timme, *Molecular pathology and age estimation*. Forensic Science International, 2010. **203**(1-3): p. 34-43.
18. Bocklandt, S., et al., *Epigenetic Predictor of Age*. Plos One, 2011. **6**(6).
19. Koch, C.M. and W. Wagner, *Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues*. Aging-Us, 2011. **3**(10): p. 1018-1027.
20. Kovatsi, L., et al., *p16 promoter methylation in Pb2+ -exposed individuals*. Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.), 2010. **48**(2): p. 124-8.
21. Nakatome, M., et al., *Methylation analysis of circadian clock gene promoters in forensic autopsy specimens*. Legal Medicine, 2011. **13**(4): p. 205-209.
22. Numachi, Y., et al., *Methamphetamine alters expression of DNA methyltransferase 1 mRNA in rat brain*. Neuroscience Letters, 2007. **414**(3): p. 213-217.
23. Masubuchi, S., et al., *Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats*. European Journal of Neuroscience, 2000. **12**(12): p. 4206-4214.
24. Pidsley, R. and J. Mill, *Epigenetic Studies of Psychosis: Current Findings, Methodological Approaches, and Implications for Postmortem Research*. Biological Psychiatry, 2011. **69**(2): p. 146-156.

25. Veldic, M., et al., *In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(6): p. 2152-2157.
26. Tsankova, N., et al., *Epigenetic regulation in psychiatric disorders*. Nature Reviews Neuroscience, 2007. **8**(5): p. 355-367.
27. Shorter, J. and S. Lindquist, *Prions as adaptive conduits of memory and inheritance*. Nature Reviews Genetics, 2005. **6**(6): p. 435-450.
28. Birky, C.W., *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models*. Annual Review of Genetics, 2001. **35**: p. 125-148.
29. Turner, B.M., *Histone acetylation and an epigenetic code*. Bioessays, 2000. **22**(9): p. 836-845.
30. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-1080.
31. Klar, A.J.S., *An epigenetic hypothesis for human brain laterality, handedness, and psychosis development*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2004. **69**: p. 499-506.
32. Vidaki, A., B. Daniel, and D.S. Court, *Forensic DNA methylation profiling-Potential opportunities and challenges*. Forensic Science International-Genetics, 2013. **7**(5): p. 499-507.
33. Tollefsbol, T., et al., *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics* 2011, London: Elsevier Inc.
34. Haig, D., *The (dual) origin of epigenetics*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2004. **69**: p. 67-70.
35. Ruden, D.M., et al., *Waddington's widget: Hsp90 and the inheritance of acquired characters*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2003. **14**(5): p. 301-310.
36. Hendrickson, H., et al., *Amplification-mutagenesis: Evidence that "directed" adaptive mutation and general hypermutability result from growth with a selected gene amplification*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(4): p. 2164-2169.
37. Roth, J.R., et al., *Regulating general mutation rates: Examination of the hypermutable state model for Cairnsian adaptive mutation*. Genetics, 2003. **163**(4): p. 1483-1496.
38. Sebat, J., et al., *Strong association of de novo copy number mutations with autism*. Science, 2007. **316**(5823): p. 445-449.
39. Sebat, J., et al., *Large-scale copy number polymorphism in the human genome*. Science, 2004. **305**(5683): p. 525-528.
40. Lobo, I., *Copy number variation and genetic disease*. Nature Education, 2008. **1**(1).
41. Singh, S., B. Murphy, and R. O'Reilly, *Epigenetic contributors to the discordance of monozygotic twins*. Clinical Genetics, 2002. **62**(2): p. 97-103.
42. Issa, J.P., *Epigenetic variation and human disease*. Journal of Nutrition, 2002. **132**(8): p. 2388S-2392S.
43. Li, E., *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(9): p. 662-673.
44. Jirtle, R.L. and M.K. Skinner, *Environmental epigenomics and disease susceptibility*. Nature Reviews Genetics, 2007. **8**(4): p. 253-262.
45. Baylin, S.B., et al., *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*. Human Molecular Genetics, 2001. **10**(7): p. 687-692.
46. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-232.
47. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes & Development, 2002. **16**(1): p. 6-21.
48. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends in Biochemical Sciences, 2006. **31**(2): p. 89-97.
49. Weber, M., et al., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. Nature Genetics, 2007. **39**(4): p. 457-466.
50. Lyko, F., B.H. Ramsahoye, and R. Jaenisch, *Development - DNA methylation in Drosophila melanogaster*. Nature, 2000. **408**(6812): p. 538-540.
51. Hashimshony, T., et al., *The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development*. Nature Genetics, 2003. **34**(2): p. 187-192.
52. Shen, L., et al., *Genome-wide profiling reveals a class of normally methylated CpG island promoters*. Plos Genetics, 2007. **3**(10): p. 2023-2036.
53. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nature Genetics, 2003. **33**: p. 245-254.

54. Okano, M., S.P. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. *Nature Genetics*, 1998. **19**(3): p. 219-220.
55. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 247-257.
56. Hata, K., et al., *Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice*. *Development*, 2002. **129**(8): p. 1983-1993.
57. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. *Nature Reviews Genetics*, 2007. **8**(4): p. 286-298.
58. Bibikova, M., et al., *Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(2): p. 123-134.
59. Feinberg, A.P., *Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease*. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 433-440.
60. Richardson, B.C., *Role of DNA methylation in the regulation of cell function: Autoimmunity, aging and cancer*. *Journal of Nutrition*, 2002. **132**(8): p. 2401S-2405S.
61. Ahuja, N., et al., *Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer*. *Cancer Research*, 1998. **58**(23): p. 5489-5494.
62. Tsai, C.N., et al., *The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the down-regulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(15): p. 10084-10089.
63. Kim, Y.I., et al., *Moderate folate-deficiency does not cause hypomethylation of hepatic and colonic DNA or c-myc-specific hypomethylation of colonic DNA in rats*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995. **61**(5): p. 1083-1090.
64. Bollati, V., et al., *Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene*. *Cancer Research*, 2007. **67**(3): p. 876-880.
65. Foltz, G., et al., *Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma*. *Cancer Research*, 2006. **66**(13): p. 6665-6674.
66. Song, F., et al., *Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): Changes in DNA methylation during development*. *Genomics*, 2009. **93**(2): p. 130-139.
67. Song, F., et al., *Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(9): p. 3336-3341.
68. Doi, A., et al., *Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts*. *Nature Genetics*, 2009. **41**(12): p. 1350-U123.
69. Illingworth, R., et al., *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. *Plos Biology*, 2008. **6**(1): p. 37-51.
70. Ladd-Acosta, C., et al., *DNA methylation signatures within the human brain*. *American Journal of Human Genetics*, 2007. **81**(6): p. 1304-1315.
71. Rakyan, V.K., et al., *DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the Human Epigenome Project*. *Plos Biology*, 2004. **2**(12): p. 2170-2182.
72. Woodfine, K., J.E. Huddleston, and A. Murrell, *Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue*. *Epigenetics & Chromatin*, 2011. **4**.
73. Singer-Sam, J., *Monoallelic Expression* *Nature Education* 2010(3(3):1).
74. Reik, W. and W. Dean, *DNA methylation and mammalian epigenetics*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(14): p. 2838-2843.
75. Morgan, H.D., et al., *Epigenetic reprogramming in mammals*. *Human Molecular Genetics*, 2005. **14**: p. R47-R58.
76. Nicholls, R.D., S. Saitoh, and B. Horsthemke, *Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes*. *Trends in Genetics*, 1998. **14**(5): p. 194-200.
77. Fyodorov, D.V. and J.T. Kadonaga, *The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription*. *Cell*, 2001. **106**(5): p. 523-525.
78. Spencer, V.A. and J.R. Davie, *Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression*. *Gene*, 1999. **240**(1): p. 1-12.
79. Happel, N. and D. Doenecke, *Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function*. *Gene*, 2009. **431**(1-2): p. 1-12.

80. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-412.
81. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
82. Grewal, S.I.S. and S.T. Jia, *Heterochromatin revisited*. Nature Reviews Genetics, 2007. **8**(1): p. 35-46.
83. Akbarian, S. and H.S. Huang, *Epigenetic Regulation in Human Brain-Focus on Histone Lysine Methylation*. Biological Psychiatry, 2009. **65**(3): p. 198-203.
84. Pidsley, R., E.L. Dempster, and J. Mill, *Brain weight in males is correlated with DNA methylation at IGF2*. Molecular Psychiatry, 2010. **15**(9): p. 880-881.
85. *The NIH Common Fund, National Institutes of Health*.
86. Levenson, J.M. and J.D. Sweatt, *Epigenetic mechanisms in memory formation*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(2): p. 108-118.
87. Ushijima, T., *Innovation - Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(3): p. 223-231.
88. Xiong, Z.G. and P.W. Laird, *COBRA: A sensitive and quantitative DNA methylation assay*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(12): p. 2532-2534.
89. Kaneda, A., et al., *Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation*. Cancer Science, 2004. **95**(1): p. 58-64.
90. Kaneda, A., et al., *Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers*. Cancer Research, 2002. **62**(22): p. 6645-6650.
91. Brena, R.M., et al., *Quantification of DNA methylation in electrofluidics chips (Bio-COBRA)*. Nat. Protocols, 2006. **1**(1): p. 52-58.
92. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(18): p. 9821-9826.
93. Xu, H.M., et al., *Bisulfite genomic sequencing of DNA from dried blood spot microvolume samples*. Forensic Science International-Genetics, 2012. **6**(3): p. 306-309.
94. Eads, C.A., et al., *MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(8).
95. Gudnason, H., et al., *Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(19).
96. Paliwal, A., T. Vaissiere, and Z. Herceg, *Quantitative detection of DNA methylation states in minute amounts of DNA from body fluids*. Methods, 2010. **52**(3): p. 242-247.
97. Rauch, T. and G.P. Pfeifer, *Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer*. Lab Invest, 2005. **85**(9): p. 1172-1180.
98. Scharf, A.N.D. and A. Imhof, *Every methyl counts - Epigenetic calculus*. Febs Letters, 2011. **585**(13): p. 2001-2007.
99. Rothstein, M.A., Y. Cai, and G.E. Marchant, *The ghost in our genes: legal and ethical implications of epigenetics*. Health matrix (Cleveland, Ohio : 1991), 2009. **19**(1): p. 1-62.
100. Fragou, D., et al., *Epigenetic mechanisms in metal toxicity*. Toxicology Mechanisms and Methods, 2011. **21**(4): p. 343-352.
101. Bock, C., *Epigenetic biomarker development*. Epigenomics, 2009. **1**(1): p. 99-110.
102. Budowle, B. and A. van Daal, *Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions*. Biotechniques, 2009. **46**(5): p. 339-+.
103. Virkler, K. and I.K. Lednev, *Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene*. Forensic Science International, 2009. **188**(1-3): p. 1-17.
104. Zubakov, D., et al., *Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples*. International Journal of Legal Medicine, 2008. **122**(2): p. 135-142.
105. Haas, C., et al., *mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR*. Forensic Science International-Genetics, 2009. **3**(2): p. 80-88.
106. Juusola, J. and J. Ballantyne, *Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids*. Forensic Science International, 2005. **152**(1): p. 1-12.

107. Zubakov, D., et al., *MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation*. International Journal of Legal Medicine, 2010. **124**(3): p. 217-226.
108. Soukos, N.S., et al., *A rapid method to detect dried saliva stains swabbed from human skin using fluorescence spectroscopy*. Forensic Science International, 2000. **114**(3): p. 133-138.
109. Virkler, K. and I.K. Lednev, *Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids*. Forensic Science International, 2008. **181**(1-3): p. E1-E5.
110. De Wael, K., et al., *In search of blood - Detection of minute particles using spectroscopic methods*. Forensic Science International, 2008. **180**(1): p. 37-42.
111. Ajin Choi, K.-J.S., Woo Ick Yang, Hwan Young Lee, *Body fluid identification by simultaneous analysis of DNA methylation and body fluid-specific bacteria*. 25 th Congress International Society for Forensic Genetics, 2013. **Melbourne**.
112. Costa, J.P., *Boletim de Medicina Legal e Toxicologia Forense*. Actas do Congresso de Medicina Legal. Vol. Vol. Volume XII (1). 1998.
113. Poon, L.L.M., et al., *Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma*. Clinical Chemistry, 2002. **48**(1): p. 35-41.
114. Li, S., *LINE-1 DNA methylation: a potential marker for discriminating monozygotic twins*. 25 th Congress International Society for Forensic Genetics, 2013.
115. Juusola, J. and J. Ballantyne, *Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification*. Forensic Science International, 2003. **135**(2): p. 85-96.
116. Nakatome, M., et al., *Diplotype analysis of the human cardiac sodium channel regulatory region in Japanese cases of sudden death by unknown causes*. Legal medicine (Tokyo, Japan), 2009. **11**(6): p. 298-301.
117. de la Grandmaison, G.L., *Is there progress in the autopsy diagnosis of sudden unexpected death in adults?* Forensic Science International, 2006. **156**(2-3): p. 138-144.
118. Li, S.X., et al., *Circadian alteration in neurobiology during protracted opiate withdrawal in rats*. Journal of Neurochemistry, 2010. **115**(2): p. 353-362.
119. Li, S.X., et al., *Morphine withdrawal produces circadian rhythm alterations of clock genes in mesolimbic brain areas and peripheral blood mononuclear cells in rats*. Journal of Neurochemistry, 2009. **109**(6): p. 1668-1679.
120. Okano, S., et al., *Unusual circadian locomotor activity and pathophysiology in mutant CRY1 transgenic mice*. Neuroscience Letters, 2009. **451**(3): p. 246-251.
121. Nagashima, K., et al., *The involvement of Cry1 and Cry2 genes in the regulation of the circadian body temperature rhythm in mice*. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2005. **288**(1): p. R329-R335.
122. Lynnerup, N., et al., *Ascertaining year of birth/age at death in forensic cases: A review of conventional methods and methods allowing for absolute chronology*. Forensic Science International, 2010. **201**(1-3): p. 74-78.
123. Migliore, L. and F. Coppede, *Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases*. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2009. **667**(1-2): p. 82-97.
124. Renthall, W. and E.J. Nestler, *Epigenetic mechanisms in drug addiction*. Trends in Molecular Medicine, 2008. **14**(8): p. 341-350.
125. Nakahata, Y., et al., *Signaling to the circadian clock: plasticity by chromatin remodeling*. Current Opinion in Cell Biology, 2007. **19**(2): p. 230-237.
126. Gavin, D.P. and R.P. Sharma, *Histone modifications, DNA methylation, and Schizophrenia*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2010. **34**(6): p. 882-888.
127. Iwamoto, K. and T. Kato, *Epigenetic Profiling in Schizophrenia and Major Mental Disorders*. Neuropsychobiology, 2009. **60**(1): p. 5-11.
128. Saha, R.N. and K. Pahan, *HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis*. Cell Death and Differentiation, 2006. **13**(4): p. 539-550.
129. Zhubi, A., et al., *An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes*. Schizophrenia Research, 2009. **111**(1-3): p. 115-122.
130. Hobara, T., et al., *Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients*. Journal of Psychiatric Research, 2010. **44**(5): p. 263-270.

